

Untersuchung molekularer Wirkungen von  
Allgemeinanästhetika an humanen 5-HT<sub>3A</sub> Rezeptoren,  
deren Kinetiken und Bedeutung für postoperative Emesis

**Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Isabelle Linden

aus

Koblenz

Bonn 2006

Angefertigt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1.Referent: PD Dr. Martin Barann

2.Referent: Prof. Dr. Volker Herzog

Tag der Promotion:

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn [http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.

Bonn 2006

Ich widme diese Arbeit  
meinem lieben kleinen Sonnenschein Felix Joel!!

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Anästhesie.....	1
1.1.1 Narkose.....	1
1.2 PONV (postoperative nausea and vomiting).....	3
1.3 Serotonin-Rezeptoren .....	4
1.4 Ligandengesteuerte (ionotrope) Ionenkanäle .....	5
1.5 5-HT <sub>3A</sub> Rezeptor.....	7
1.6 Zielsetzung dieser Arbeit.....	8
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>10</b>
2.1 Material: .....	10
2.1.1 Verbrauchsmaterial und Reagenzien.....	10
2.1.2 Medium, Puffer und Lösungen.....	11
2.1.2.1 Medium für die Zellkultur:.....	11
2.1.2.2 Puffer für die Patch-Clamp-Experimente:.....	11
2.1.2.3 Lösungen für die Patch-Clamp Experimente: .....	12
2.1.3 Geräte .....	13
2.1.4 Software.....	13
2.2 Methoden:.....	14
2.2.1 Zellkultur .....	14
2.2.1.1 stabile Transfektion .....	14
2.2.1.2 Kryokonservierung .....	14
2.2.1.3 Zellkultur .....	14
2.2.2 Patch-Clamp-Technik.....	15
2.2.2.1 Durchführung der Patch-Clamp-Experimente.....	16
2.2.2.2 Applikationssystem (RSC 200) .....	18
2.2.2.3 Lösungsapplikation.....	18
2.2.2.4 Datenanalyse.....	21
2.2.3 High Performance Liquid Chromatography (HPLC) .....	27
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>31</b>
3.1 Charakterisierung des Applikationssystems.....	31
3.2 Grundcharakterisierung des 5-HT <sub>3A</sub> Rezeptors.....	35
3.2.1 Agonisten- (5-HT-) Konzentrations-Wirkungskurve .....	35
3.2.2 Aktivierungs-( $\tau_{akt}$ ) und Desensibilisierungszeitkonstanten ( $\tau_{des}$ ) .....	36
3.2.3 Recovery .....	37
3.3 Effekte von Phenolderivaten am 5-HT <sub>3A</sub> Rezeptor.....	38

3.3.1 Konzentrations-Wirkungskurven von Propofol .....	39
3.3.2 Einwasch und Auswasch von Propofol .....	42
3.3.2.1 ++ Einwasch/Auswasch.....	42
3.3.2.2 +- Einwasch/Auswasch (5 $\mu$ M Propofol).....	43
3.3.2.3 +- Einwasch/Auswasch (14 $\mu$ M Propofol).....	44
3.3.2.4 +- Einwasch/Auswasch (29 $\mu$ M Propofol).....	45
3.3.2.5 +- Einwasch/Auswasch (51 $\mu$ M Propofol).....	45
3.3.2.6 10s/ 60s/ 300s Einwasch/Auswasch (14 $\mu$ M Propofol).....	46
3.3.3 Konzentrationssprungexperimente .....	48
3.3.3.1 Propofol (5 $\mu$ M).....	48
3.3.3.2 Propofol (14 $\mu$ M).....	49
3.3.3.3 Propofol (29 $\mu$ M).....	50
3.3.3.4 Propofol (51 $\mu$ M).....	51
3.3.3.5 Propofol (172 $\mu$ M).....	52
3.3.3.6 Vergleich der Zeitkonstanten der Konzentrationssprünge .....	53
3.3.4 Kompetitivitätstest.....	54
3.3.5 Isopropylphenol: Konzentrations-Wirkungskurven .....	56
3.3.6 Isopropylphenol: Einwasch und Auswasch.....	58
3.3.7 Isopropylphenol: Konzentrationssprungexperimente.....	59
3.3.7.1 Isopropylphenol (21 $\mu$ M) mit/ohne 30 $\mu$ M 5-HT.....	59
3.3.7.2 Isopropylphenol (21 $\mu$ M) mit 30 $\mu$ M/ 300 $\mu$ M 5-HT.....	60
3.3.8 Isopropylphenol: Kompetitivitätstest .....	62
3.3.9 Phenol: Konzentrations-Wirkungskurve .....	64
3.4 Effekte von Barbituraten und deren Derivaten am 5-HT <sub>3A</sub> Rezeptor .....	66
3.4.1 Methohexital: Konzentrations-Wirkungskurve .....	67
3.4.2 Methohexital: Einwasch und Auswasch.....	68
3.4.3 Methohexital: Konzentrationssprünge.....	69
3.4.3.1 Konzentrationssprünge: 100 $\mu$ M Methohexital.....	69
3.4.3.2 Konzentrationssprünge: 300 $\mu$ M Methohexital.....	70
3.4.4 Thiopental: Konzentrations-Wirkungskurve .....	72
3.4.5 Thiopental: Einwasch und Auswasch.....	73
3.4.6 Thiopental: Konzentrationssprünge.....	74
3.4.6.1 Konzentrationssprünge: 100 $\mu$ M Thiopental.....	74
3.4.6.2 Konzentrationssprünge: 300 $\mu$ M Thiopental.....	75
3.4.7 Inactin (Ethylbutylthiobarbital): Konzentrations-Wirkungskurve .....	77
3.4.8 Inactin: Einwasch und Auswasch.....	78
3.4.9 Inactin: Konzentrationssprünge.....	79
3.4.9.1 Konzentrationssprünge: 300 $\mu$ M Inactin.....	79

3.4.9.2 Konzentrationssprünge: 1000 $\mu$ M Inactin .....	80
3.4.10 Pentobarbital: Konzentrations-Wirkungskurve .....	81
3.4.11 Pentobarbital: Einwasch und Auswasch .....	82
3.4.12 Pentobarbital: Konzentrationssprünge .....	83
3.4.12.1 Konzentrationssprünge: 300 $\mu$ M Pentobarbital .....	83
3.4.13 Secbutabarbital: Konzentrations-Wirkungskurve .....	85
3.4.14 Secbutabarbital: Einwasch und Auswasch .....	86
3.4.15 Secbutabarbital: Konzentrationssprünge .....	87
3.4.15.1 Konzentrationssprünge: 1000 $\mu$ M Secbutabarbital .....	87
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>88</b>
4.1 Validität der Daten .....	88
4.2 Bestimmung der Propofol- und Isopropylphenolkonzentrationen .....	89
4.3 Wirkungen der Phenolderivate am 5-HT <sub>3A</sub> Rezeptor .....	89
4.3.1 Allgemein mögliche Auswirkung von Anästhetika auf 5-HT <sub>3A</sub> Rezeptoren .....	89
4.3.2 Konzentrations-Wirkungskurven der Phenolderivate .....	90
4.3.3 Einfluß auf Aktivierung und Desensibilisierung .....	93
4.3.4 Kinetiken der durch die Phenolderivate induzierten Effekte .....	94
4.3.5 Kompetitivität .....	96
4.3.6 Molekulare Wirkung der Phenolderivate .....	97
4.4 Wirkungen der Barbituratderivate am 5-HT <sub>3A</sub> Rezeptor .....	100
4.4.1 Auswahl der Barbituratderivate .....	100
4.4.2 Konzentrations-Wirkungskurven der Barbituratderivate .....	101
4.4.3 Kinetiken der Barbituratderivate .....	101
4.4.4 Einfluß auf Aktivierung und Desensibilisierung der Barbituratderivate .....	103
4.4.5 Konzentrationssprungeffekte der Barbituratderivate .....	103
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>105</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>107</b>
<b>7. Lebenslauf .....</b>	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>
<b>8. Danksagung .....</b>	<b>116</b>
<b>9. Veröffentlichungen .....</b>	<b>117</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Anästhesie

Die analgetischen und anästhetischen Eigenschaften von Distickstoffoxid (Lachgas) wurden von Priestley und Davy als erste beschrieben. 1844 machte der Zahnarzt H. Wells in Hartford während einer Vorstellung einer Wanderbühne die Entdeckung, dass ein Freiwilliger, der als besondere Attraktion Lachgas eingeatmet hatte, sich währenddessen eine klaffende Unterschenkelwunde zugezogen hatte, ohne dabei eine Schmerzreaktion zu zeigen. Wells erkannte die Bedeutung dieses Vorganges und unterzog sich selbst einer Zahnextraktion unter Lachgas, wobei auch er keinerlei Schmerzen empfand. Als er mit seiner Entdeckung an die Öffentlichkeit trat und eine schmerzlose Zahnoperation durchführen wollte, misslang der Versuch. Doch die Entwicklung der Narkose war nicht mehr aufzuhalten. William Morton gelang 1846 die erste klinische Narkose mit Äther. 1847 wurde durch J. Simpson Chloroform als Narkosemittel eingeführt. Schließlich wurden Operationen nur noch unter Narkose durchgeführt.

### 1.1.1 Narkose

Eine wissenschaftliche Beschreibung der Narkose lautet „pharmakologisch induziertes, reversibles Koma“.

Die Narkose führt zur Lähmung von Teilen des Zentralen Nervensystems und ist durch vier Eigenschaften gekennzeichnet:

1. Bewusstseinsverlust (Hypnose), wodurch psychischer Stress während der Operation vermieden wird,
2. Schmerzausschaltung (Analgesie),
3. Muskelentspannung (Relaxation), diese macht verschiedene Operationen, wie z. B. Bauchoperationen, technisch erst möglich,
4. Reflexdämpfung.

Substanzen, mit denen Narkosen durchgeführt werden, bezeichnet man als Allgemeinanästhetika. Diese werden je nach Applikationsart in Inhalationsanästhetika (z.B. Halothan, Enfluran, Isofluran, Sevofluran) und Injektionsanästhetika (wie Methohexital, Thiopental, Propofol, Ketamin, Etomidat und Opioide) eingeteilt.

Das ideale Narkosemittel sollte folgende Eigenschaften haben:

- gute analgetische und narkotische Wirkung
- möglichst geringe Beeinflussung von Atmung sowie Kreislauf
- Reizlosigkeit an Haut und Schleimhaut
- keine Bildung schädlicher Metaboliten
- geringe Toxizität und somit große therapeutische Breite
- leichte Handhabung
- günstige physikalische und chemische Eigenschaften (lagerungsstabil, nicht brennbar)
- gute Umweltverträglichkeit nach Entweichen in die Atmosphäre

Keines der derzeit zur Verfügung stehenden Narkosemittel erfüllt sämtliche genannten Eigenschaften, wodurch es nach Narkosen zu unterschiedlichen Nebenwirkungen kommen kann. Zu diesen Nebenwirkungen gehören Intubationsschäden, Aspiration von Mageninhalt, Intraoperative Wachzustände und Übelkeit / Erbrechen (PONV = postoperative nausea and vomiting).



## 1.2 PONV (postoperative nausea and vomiting)

Postoperative Übelkeit und Erbrechen sind ein sehr häufiges Problem (ca. 20-30 %), welches nach Operationen, bzw. nach der Behandlung mit Anästhetika, Anti-Migräne-Medikamenten, Zytostatika oder Steroidhormonen auftritt. Als Vorsorge bei Operationen ist folglich die Wahl der Anästhetika von großer Bedeutung (Apfel et al. 1999; Eberhart et al. 1999). Übelkeit und Erbrechen können über periphere und/oder zentrale Nervenbahnen ausgelöst werden. Sie sind Bestandteile eines Schutzreflexes gegen Vergiftungen. Die Koordination des Brechreflexes erfolgt im Brechzentrum im Hirnstamm (siehe Abb.1).

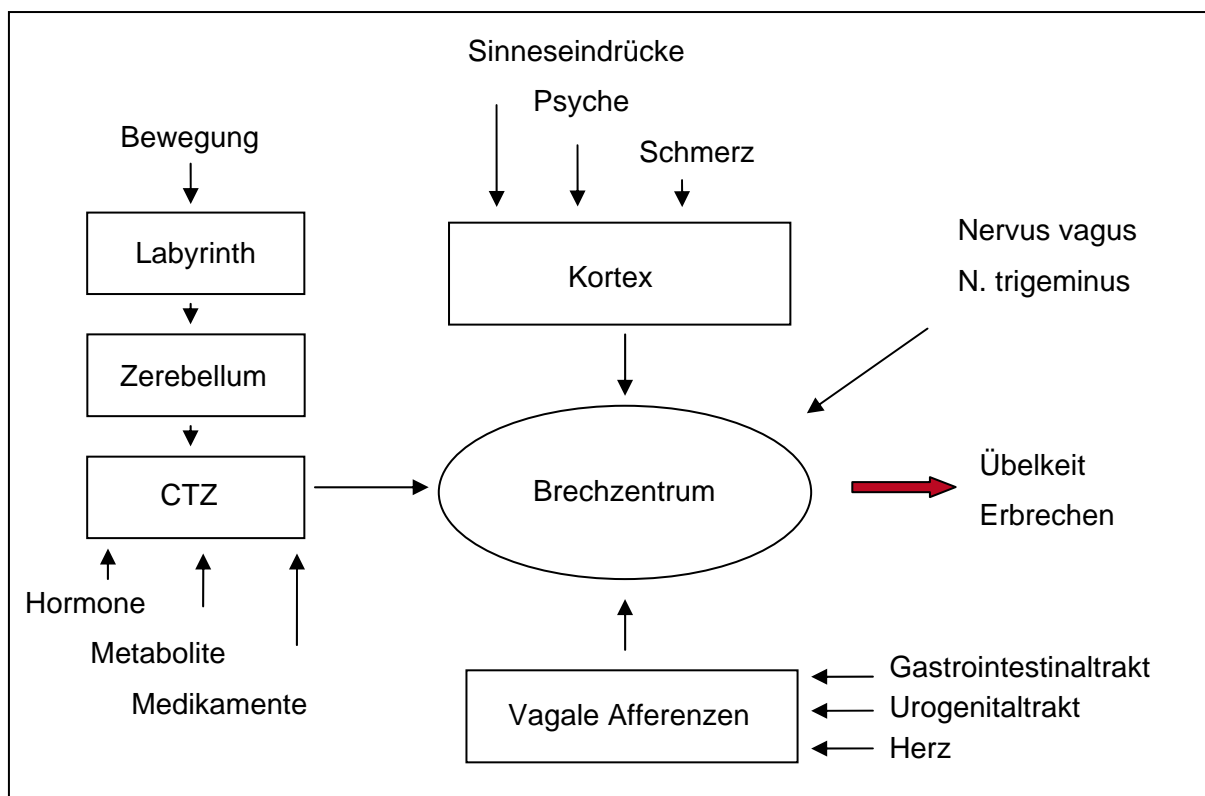


Abbildung 1: Brechreiz (modifiziert nach Dr. Wiprächtiger)

Peripher erfolgt die Stimulation der Übelkeit und des Brechreizes in der Hauptsache über vagale Afferenzen, welche durch Serotonin (5-HT), das hauptsächlich aus enterochromaffinen Zellen freigesetzt wird, stimuliert werden. Zentraler Stimulationsort ist die Chemorezeptortriggerzone (CTZ) in der Area postrema, welche über Medikamente stimuliert werden kann, die eigentlich peripher wirken, da an dieser Grenzregion die Blut-Hirnschranke übertreten werden kann. Andere Zentren, die zum Erbrechen führen, sitzen direkt im Gehirn. Der Brechreflex ist folglich ein multifaktoriell auslösbarer Effekt. In der Chemorezeptortriggerzone können ca. 30 unterschiedliche Rezeptoren unterschieden

werden. Einer von diesen ist der 5-HT<sub>3</sub> Rezeptor. Dieser sitzt in allen Übelkeit modulierenden Zentren und es ist bekannt, dass seine Antagonisten erfolgreich Übelkeit und Erbrechen vermindern können (Tramer et al. 1997a;Kovac 2000).

### 1.3 Serotonin-Rezeptoren

Derzeit sind 14 verschiedene Serotoninrezeptoren bekannt, die in 7 Hauptgruppen (5-HT<sub>1</sub>-5-HT<sub>7</sub>) eingeteilt werden (Abb. 2). Früher wurden die Serotoninrezeptoren wegen ihrer Hemmbarkeit durch Morphin und Dibenzylin in M- und D- Rezeptoren (Gaddum and Picarelli 1997) eingeteilt. Heute entspricht der ehemalige M-Typ dem 5-HT<sub>3</sub> Rezeptor und der D-Typ dem 5-HT<sub>2</sub> Rezeptor (Bradley et al. 1986;Hartig 1989;Frazer et al. 1990;Peroutka 1990a;Peroutka 1990b;Gothert 1992b).

Rezeptor	Subtyp	Vorkommen	Effekt
5-HT <sub>1</sub>	5-HT <sub>1A</sub> , 5-HT <sub>1B</sub> , 5-HT <sub>1D</sub> , 5-HT <sub>1E</sub> , 5-HT <sub>1F</sub>	ZNS	Angstreaktionen, Blutdrucksenkung, motorische Aktivität
5-HT <sub>2</sub>	5-HT <sub>2A</sub> , 5-HT <sub>2B</sub> , 5-HT <sub>2C</sub>	ZNS, glatte Muskulatur, Thrombozyten	Neuronale Erregung,
5-HT <sub>3</sub>	5-HT <sub>3A</sub> , 5-HT <sub>3B</sub>	ZNS, affarente Vagusneuron, Darmnervensystem, Area postrema, Schmerzfasern	Übelkeit, Erbrechen, Schmerz
5-HT <sub>4</sub>		Kolon, Herz, ZNS	
5-HT <sub>5</sub>	5-HT <sub>5A</sub> , 5-HT <sub>5B</sub>		Inhibierung der Adenylylcyclase
5-HT <sub>6</sub>			
5-HT <sub>7</sub>		Ubiquitär	Regulation des Tag-Nacht-Rhythmus und der Körpertemperatur

Abbildung 2: Serotoninrezeptoren und ihre Effekte

Der 5-HT<sub>3</sub> Rezeptor gehört als einziger der 5-HT Rezeptoren zur Familie der ligandengesteuerten (ionotropen) Ionenkanäle, alle anderen sind in der Familie der G-Protein gekoppelten (metabotrope) Rezeptoren einzuordnen (Gothert 1992a;Boess and

Martin 1994; Jackson and Yakel 1995; Ortells and Lunt 1995; Hartig 1997; Barnes and Sharp 1999).

## 1.4 Ligandengesteuerte (ionotrope) Ionenkanäle

In der Zellmembran kommen durch Proteine gebildete Ionenkanäle vor, die durch Konformationsänderungen geöffnet oder geschlossen werden können. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Geometrie und Ladungsverteilung lassen sie im geöffneten Zustand meist nur bestimmte Ionen durchtreten. Den Ionen entsprechend, für die sie selektiv permeabel sind, unterscheidet man Natrium-, Kalium-, Calcium und Chloridkanäle. Treibende Kraft für den jeweiligen Ionenfluss ist der Konzentrationsgradient zwischen Extra- und Intrazellularraum sowie das elektrische Potential. Das Ausmaß des Ionenflusses hängt von der Zahl der geöffneten Kanäle, der Öffnungsdauer sowie der Permeabilität für die entsprechenden Ionen, der sog. Leitfähigkeit, ab. Werden die Kanäle durch Bindung von Liganden geöffnet oder geschlossen, bezeichnet man sie als ligandengesteuerte Ionenkanäle oder Ionenkanal-Rezeptoren. Erfolgt die Öffnung und Schließung der Kanäle dagegen durch Membrandepolarisation oder –hyperpolarisation, spricht man von spannungsabhängigen Ionenkanälen (Mutschler Ernst et al. 2001). Die ligandengesteuerten Ionenkanäle sind häufig pentamere Proteinkomplexe, die sich aus verschiedenen Untereinheiten zusammensetzen und dabei den Ionenkanal bilden.

Aufgrund ihrer Aminosäuresequenz werden die ligandengesteuerten Ionenkanäle in zwei Hauptgruppen eingeteilt:

1. Die Gruppe der Glutamatrezeptoren,
2. die Gruppe der ATP-, GABA ( $\gamma$ -Aminobuttersäure)<sub>A</sub>-, Glycin-, 5-HT<sub>3</sub>- und Azetylcholin-Rezeptoren.

Da die Azetylcholinrezeptoren bisher am eingehendsten untersucht wurden, soll an diesem Beispiel die Struktur und Eigenschaft von Ionenkanälen kurz beschrieben werden.

Die extrazellulären Domänen des Azetylcholinrezeptors formen einen Trichter, der die Interaktion zwischen den Ionen und der Kanalwand ermöglicht (Unwin 1993). Dieser Trichter verengt sich in der Mitte der Membrandoppelschicht, wo sich auch das sog. gate befindet (Abb. 3). Jede der fünf Untereinheiten des Rezeptors wird von vier transmembranären Domänen (TM<sub>1</sub>-TM<sub>4</sub>) gebildet, welche durch hydrophobe Aminosäuren in der Lipidmembran stabilisiert werden. Der N-Terminus, der C-Terminus und die Schleife zwischen TM<sub>2</sub> und TM<sub>3</sub> befinden sich im Extrazellularraum, während sich die Schleifen

zwischen  $TM_1$  und  $TM_2$  und zwischen  $TM_3$  und  $TM_4$  im Intrazellulärraum befinden (Abb. 3).

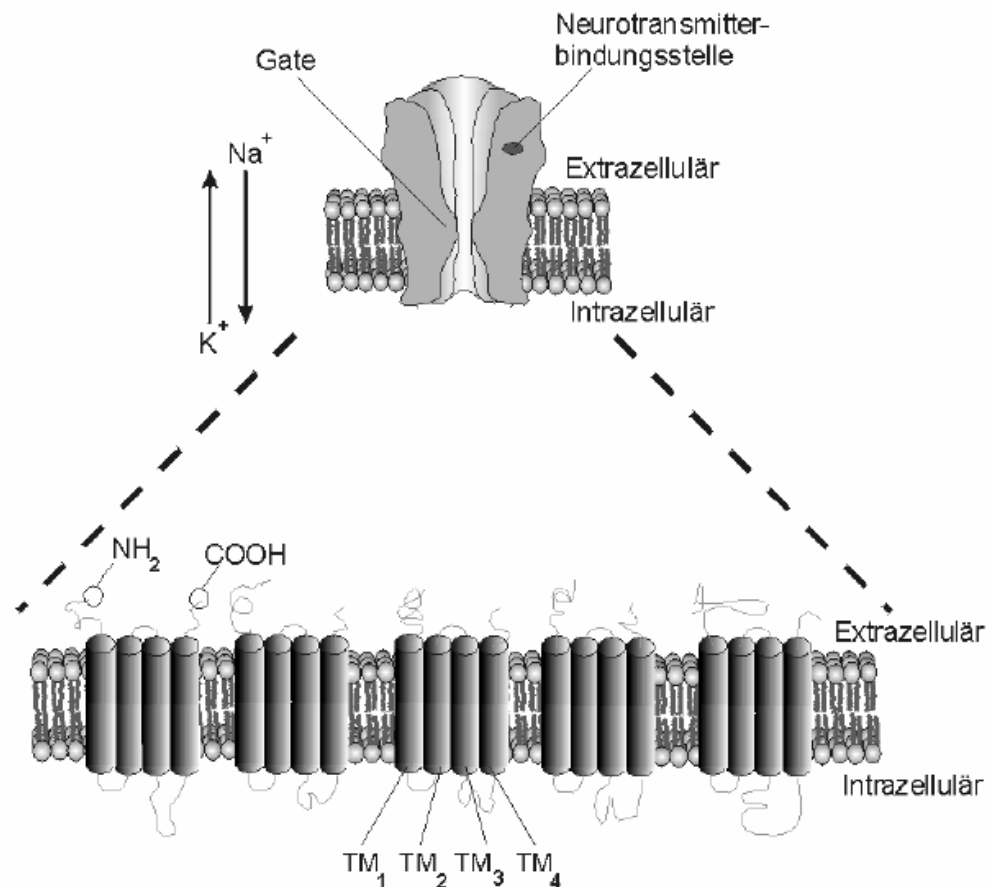


Abbildung 3: Darstellung eines Ionenkanals (modifiziert nach Waxham, 1999)

Die Kanalpore wird hauptsächlich durch die  $TM_2$ -Segmente begrenzt. Die Aminosäuren der  $TM_2$ -Segmente sind so angeordnet, dass die negativ geladenen Aminosäuren drei Ringe um die Pore bilden, wodurch nur Kationen den Kanal passieren können, während Anionen wegen der Ladungsabstoßung weitgehend ausgeschlossen sind (Hille 1984; Imoto et al. 1988). Die Bindung des Agonisten wird innerhalb einer Untereinheit des Azetylcholinrezeptors durch zwei benachbarte Cysteinreste, die eine Disulfidbrücke bilden, vermittelt. Diese Struktur ist auch bei anderen ionotropen Rezeptoren vorhanden. Nach der Bindung kommt es zu einer Konformationsänderung des Proteins durch eine Drehung der  $TM_2$ -Segmente um ihre Längsachse. Dies verursacht die Kanalöffnung und ermöglicht den Ionenfluss entlang des elektrochemischen Gradienten. Das Schließen der Kanäle erfolgt durch Dissoziation des Agonisten (Deaktivierung) und / oder durch Desensibilisierung (Lambert et al. 1989).

Der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor besitzt eine ähnliche Ionenselektivität wie der Azetylcholinrezeptor.

## 1.5 5-HT<sub>3A</sub> Rezeptor

Der 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor zeigt sehr große strukturelle und funktionale Homologien zum Azetylcholinrezeptor (Yang 1990;Reeves and Lummis 2002;Thompson and Lummis 2003;Price and Lummis 2004) (Abb.4).

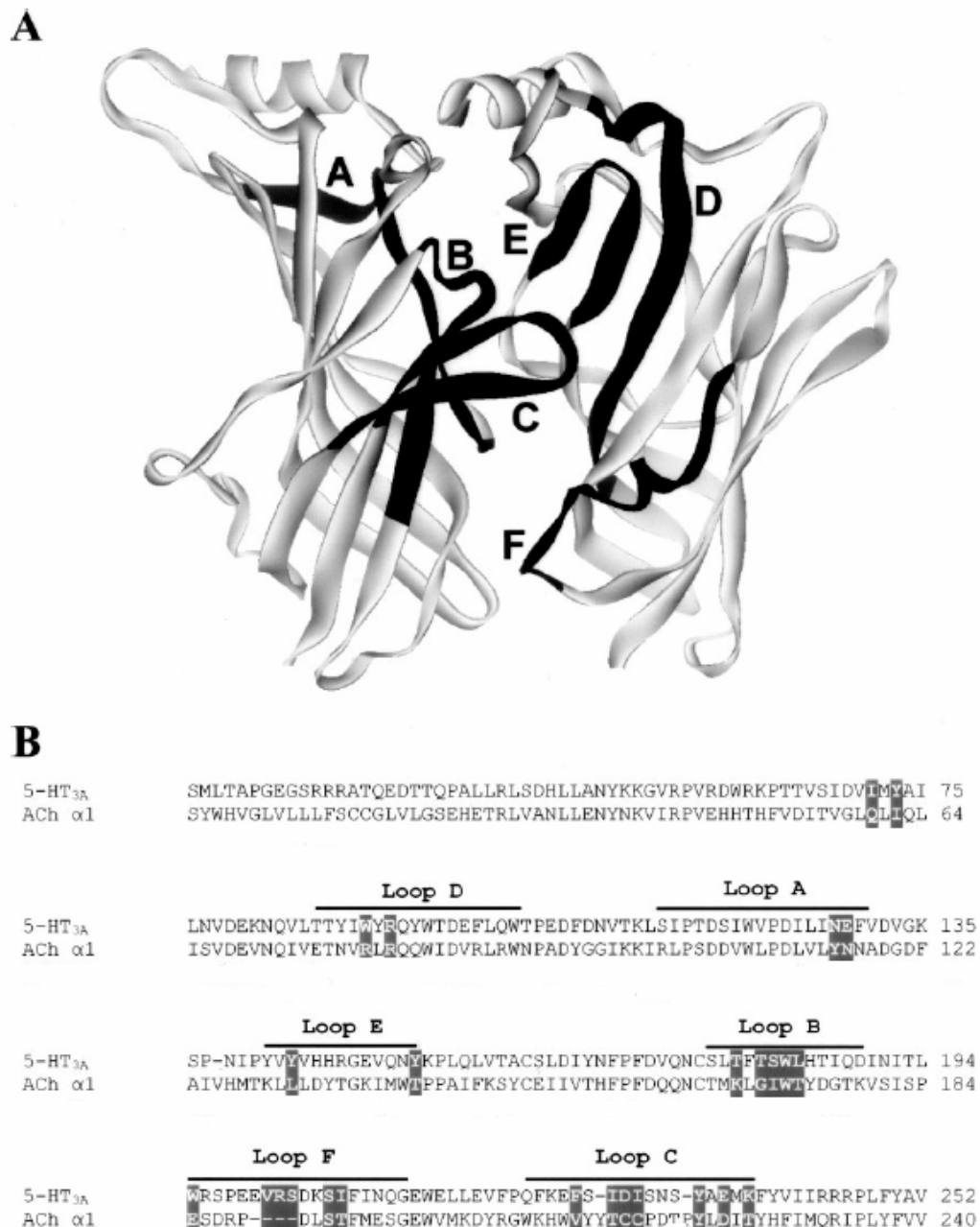


Abbildung 4: A: Zwei Untereinheiten des 5-HT<sub>3A</sub> Rezeptors mit den Hauptbindungsloops, B: die dazugehörigen Sequenzen (modifiziert nach Thompson).

Die Aktivierung von 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren führt zu einer erhöhten Aktivität viscerosaffektiver Neurone und verursacht so unter anderem Übelkeit. Das glykosilierte, extrazelluläre N-Terminal des 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors fungiert als Bindungsstelle für Serotonin (Eisele et al. 1993; Lummis 2004). Die Aktivierung erfolgt im Vergleich zu anderen ionotropen Rezeptoren vergleichsweise langsam. Dieser Ionenkanal ist kationenselektiv und zwar überwiegend für monovalente Na<sup>+</sup> und K<sup>+</sup> Ionen, aber auch für divalente Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> Ionen. (Hargreaves et al. 1994; Barnes and Sharp 1999). Der Agonist bewirkt nach der Kanalöffnung die Desensibilisierung der Rezeptoren, welche durch verschiedene Faktoren, wie z.B. den Differenzierungszustand der Zellen oder die extrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration (Shao et al. 1991; Lobitz et al. 2001) beeinflusst werden kann. Der Austausch des 4<sup>ten</sup> Lysin-Restes der TM<sub>2</sub>-Domäne, bzw. des Leu<sup>286</sup> im TM<sub>2</sub>-Segmentes durch andere Aminosäuren führt zu einer Beschleunigung bzw. Verlangsamung der Desensibilisierung (Shao et al. 1991; Yakel et al. 1993; Gunthorpe et al. 2000).

Die für diese Arbeit wichtige 3A-Untereinheit des 5-HT<sub>3</sub> Rezeptors wurde 1995 erstmals aus Humangewebe kloniert. Sie besteht aus 487 Aminosäuren. Diese Untereinheit besitzt wie die anderen ligandengesteuerten Ionenkanäle eine Cystein-Schleife in der N-terminalen Domäne (Maricq et al. 1991; Yakel et al. 1993; Belelli et al. 1995). Die klonierten 5-HT<sub>3A</sub>-Untereinheiten können heterolog in HEK 293 Zellen exprimiert werden (Bruss et al. 1998). Die transfizierten Zellen bilden aus den Untereinheiten ein homopentameres Protein, welches als funktionaler Rezeptor-Kanal in die Membran eingelagert wird. Diese Kanäle bilden ein hervorragendes Modell, um die Kinetik des nativen 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors sowie die von Pharmakaeffekten zu erforschen, da sie diesem in ihren pharmakologischen und biophysikalischen Eigenschaften sowie strukturell in vielerlei Hinsicht entsprechen (Brady et al. 2001), sowie eine konstante Stöchiometrie der Untereinheiten aufweisen.

## 1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Um die Ausprägungen und Mechanismen von Übelkeit und Erbrechen pharmakologisch verstehen zu können, ist es notwendig, die Wechselwirkungen zwischen Arzneimitteln und den jeweiligen Wirkorten auf molekularer Ebene zu charakterisieren. Die Entwicklung eines schnellen Applikationssystems, des „rapid solution exchange system“, hat die Voraussetzung geschaffen, an stabil transfizierten humanen 5-HT<sub>3A</sub> Rezeptoren Einflüsse verschiedener Arzneimittel zu untersuchen. Diese Arbeit befasst sich mit der

elektrophysiologischen Untersuchung molekularer Wirkungen von für Narkose relevanten Arzneistoffen, sowie deren strukturell ähnlichen Derivaten mit folgenden Zielen:

1. Das „rapid solution exchange system“ zu charakterisieren und zu optimieren.
2. Die Wirkung von Phenolderivaten am 5-HT<sub>3A</sub> Rezeptor zu charakterisieren.
3. Die Wirkung von Barbituratderivaten am 5-HT<sub>3A</sub> Rezeptor zu charakterisieren.
4. Durchführung einer Strukturanalyse und der Vergleich von Wirkähnlichkeiten bzw. Wirkunterschieden, um Hinweise auf molekulare Wirkmechanismen zu bekommen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material:

#### 2.1.1 Verbrauchsmaterial und Reagenzien

Verbrauchsmaterial und Reagenzien	Hersteller
Acetonitrile	Merck, Darmstadt
Borosilikat-Glaskapillaren	World Precision Instruments, FL, USA
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Cyclohexan	Merck, Darmstadt
Cyclohexanol	Merck, Darmstadt
Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
EGTA	Sigma Aldrich, Steinheim
Ethylbutylthiobarbital	Sigma Aldrich, Steinheim
Fötales Kälberserum	Biochrom, Berlin
HEPES (9105.3)	Carl Roth, Karlsruhe
HEK 293 Zelllinie	Pharmakologisches Institut, Bonn
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid	Sigma, St.Louis, MO, USA
Klonzylinder	Sigma Aldrich, Steinheim
Kulturflaschen	Nunc, Wiesbaden
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Isopropylphenol	Sigma Aldrich, Steinheim
Magnesiumchlorid	Sigma Aldrich, Steinheim
Methanol	Riedel-de Haen Seelze
Methohexital	Sigma Aldrich, Steinheim
Natriumchlorid	KMF Laborchemie, Lohmar
Natriumhydrochlorid-Lösung	Hedinger, Stuttgart
Nitrogen	Linde, Höllriegelskreuth
Paneticin	Biotech, Aidenbach
Pentobarbital	Sigma Aldrich, Steinheim
Petrischalen (35 mm Durchmesser)	Nunc, Wiesbaden
Phenol	Sigma Aldrich, Steinheim



Penicillin-Streptomycin-Glutamin (PSG)	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Propofol (2,6-Diisopropylphenol)	RBI, Natick, MA, USA
Thiobarbital	Sigma Aldrich, Steinheim
Thymol (5-Methyl-2-[1-methylethyl]phenol)	Sigma Aldrich, Deisenhofen
Secbutabarbital	Chemische Fabrik Berg, Bitterfeld
Serotonincreatininsulfatkomplex	Sigma Aldrich, Steinheim
Silberdrähte	Science Products, Hofheim

## 2.1.2 Medium, Puffer und Lösungen

### 2.1.2.1 Medium für die Zellkultur:

DMEM-Nutrix F12 ohne Glutamin (Gibco)

10 % fötales Kälberserum (inaktiviert bei 57° C für ca. 30 min)

1 % (PSG): 10.000 E Penicillin

10.000 mg Streptomycin

29,2 mg Glutamin

3 % Natriumbicarbonat

ca. 1,5 % Panecitin

### 2.1.2.2 Puffer für die Patch-Clamp-Experimente:

a) Extrazelluläre Pufferlösung (ECS) gelöst in 5 l aqua bidest.

Natriumchlorid (NaCl) = 150 mM

Calciumchlorid (CaCl) = 1,8 mM

Magnesiumdichlorid in Wasser (MgCl<sub>2</sub>\*6 H<sub>2</sub>O) = 1mM

HEPES = 10 mM

Kaliumhydroxid (KOH) = 5,6 mM

Um einen physiologischen pH-Wert von 7,45 zu erhalten, wurde dieser je nach Bedarf mit Salzsäure oder Natronlauge eingestellt.

b) Intrazelluläre Pufferlösung (ICS)

Kaliumchlorid (KCl) = 140 mM

Magnesiumdichlorid (MgCl<sub>2</sub>) = 5mM

HEPES = 10 mM

EGTA = 10 mM

Kaliumhydroxid (KOH) = 1,9 mM

gelöst in 1 l aqua bidest. Um einen physiologischen pH-Wert von 7,3 zu erhalten, wurde dieser je nach Bedarf mit Salzsäure oder Kaliumhydroxid eingestellt.

2.1.2.3 Lösungen für die Patch-Clamp Experimente:

a) Barbituratlösungen:

Die Lösungen für die Barbituratmessungen wurden alle auf ECS-Basis angesetzt. Je nach Konzentration wurde die entsprechende Menge des jeweiligen Barbiturats hinzugegeben. Der „Stock“ wurde entweder täglich frisch hergestellt oder bei -20° C gelagert und einmal verwendet.

b) Propofol- / Isopropylphenol- / Phenollösungen:

Für Propofol- und die Propofolderivatmessungen wurde erst eine 1M Stammlösung mit Ethanol hergestellt, die bei – 20° C aufbewahrt werden konnte. Diese wurde dann zu der zu messenden Konzentration mit ECS herunterverdünnt und konnte nach mind. 2 stündigem Rühren als Perfusionslösung eingesetzt werden. Um einem Zerfall der Perfusionslösung vorzubeugen, wurde diese ständig vor Lichteinfluß geschützt. Die maximale Ethanolkonzentration in den finalen Lösungen war  $\leq 1,7$  mM und blieb ohne Effekt.

c) Serotoninlösung:

Um einen 50 mM Serotoninstock herzustellen, wurden 0,4843 g des Serotonin-kreatinsulfatkomplexes in 25 ml aqua bidest. gelöst. Diese Lösung wurde anschließend aliquotiert und bei -20° C eingefroren.

Je nach gewünschter Konzentration konnte diese Lösung dann für die Experimente verwendet werden. Für die typischen Kontrollstromspuren mit 30  $\mu$ M Serotonin wurden 60  $\mu$ l Serotoninlösung/100 ml ECS eingesetzt.

### 2.1.3 Geräte

Geräte	Hersteller
Axiovert 25 Umkehrmikroskop	Zeiss, Jena
Bessel Lowpass-Filter	Frequency Devices, MA, USA
Digidata 1200 Analog/Digitalumwandler	Axon Instruments, Molecular Devices Corporation, CA, USA
EVH-9	Biologic Science Instruments, Claix, Frankreich
High Performance Liquid Chromatograph	Shimadzu Europa, Duisburg
Klimabrutschrank BB 6060	Heraeus, Hanau
ID 30 Mikroskop	Zeiss, Jena
L/M-CPZ 101 Hitze-Polierapparatur	List Medical, Darmstadt
L/M-EPC-7 Patch-clamp-Verstärker	List Medical, Darmstadt
Telaval 31 Mikroskop	Zeiss, Jena
Patch-Pipette-Puller PA-10	ESF Elektronik, Göttingen
Rapid solution exchange (RSC 200)	Biologic Science Instruments, Claix, Frankreich
Supelcosil-Säule	Sigma Aldrich, Deisenhofen

### 2.1.4 Software

Software	Hersteller
GraphPad Prism <sup>®</sup>	GraphPad, CA, USA
Microsoft Office 2003 <sup>®</sup>	Microsoft Corporation, CA, USA
RSC V1.04	Biologic Science Instruments, USA
pClamp <sup>®</sup> 8 + clampfit	Axon Instruments, Molecular Devices Corporation, CA, USA

## 2.2 Methoden:

### 2.2.1 Zellkultur

#### 2.2.1.1 stabile Transfektion

Die Transfektion der humanen (h) 5-HT<sub>3A</sub> Rezeptor cDNA in die menschliche embryonale Nierenzelllinie (HEK 293) wurde im Institut für Pharmakologie (Abt. Bönisch/Brüss) der Universität Bonn durchgeführt. Diese Zelllinie wurde anfänglich in der virologischen Forschung eingesetzt (Brown and Petric 1986). Sie erfolgte nach der Calciumphosphat-Methode (Chen und Okayama, 1987) mit Hilfe des pCDNA3 (Invitrogen) Vektors, unter Kontrolle des humanen Cytomegalovirus Promotors.

Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen durch Zugabe von Geneticin (800 µg/ml) selektioniert. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt und nach Auftreten einzelner Zellkolonien wurden diese durch spezielle Klonzylinder (Sigma) getrennt und anschließend in 24-well Kulturplatten (Falcon) bis zur Konfluenz kultiviert. Aus jeder Transfektion wurden 20-40 Kolonien hinsichtlich erfolgreicher Expression der humanen 5-HT<sub>3A</sub> Rezeptoren mit [<sup>14</sup>C]Guanidinium Influx und Bindung des selektiven 5-HT<sub>3</sub> Rezeptor Antagonisten [<sup>3</sup>H]GR 65630 [3-(5-methyl-1H-imidazol-4-yl)-1(1-methyl-1H-indol-3-yl)-1-propanone] oder durch spezielle [<sup>3</sup>H]5-HT Aufnahmeexperimente getestet. Die Kolonien mit der besten Expression wurden kryokonserviert.

#### 2.2.1.2 Kryokonservierung

Die Zellen, die für die Kryokonservierung vorgesehen waren, wurden unter sterilen Bedingungen abgeerntet und bei 1000 U/min 10 min lang zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 10% DMSO-haltigem Einfriermedium resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Diese wurden für 1-2 h bei -20° C, dann bei -80° C eingefroren.

#### 2.2.1.3 Zellkultur

Die Kultivierung der mit dem humanen 5-HT<sub>3A</sub> Rezeptor stabil transfizierten HEK 293 Zellen erfolgte nach Standardmethoden. Alle Lösungen, Gefäße und andere Materialien, die mit den Zellen in Kontakt gebracht wurden, waren steril. Die Zellen waren kryokonserviert und wurden erst in Kulturflaschen, dann in Petrischalen (Durchmesser: 35 mm) kultiviert. Die Kultivierung erfolgte in DMEM-Medium, welches mit 10 % FKS und 1% Penicillin/Streptomycin/Glutamin supplementiert wurde. Die Kulturen wurden in

einem Brutschrank bei 37° C, 95% Luftfeuchtigkeit und in einer mit 5 % CO<sub>2</sub> angereicherten Atmosphäre inkubiert.

### 2.2.2 Patch-Clamp-Technik

Biologische Membranen enthalten neben Lipiden und anderen Proteinen auch spezielle Proteine, die zum Transport von Ionen durch die Membran dienen. Mittels dem von Neher und Sakman entwickelten Verfahren (Hamill et al. 1981; Sakmann and Neher 1984), der Patch-Clamp-Technik, kann ein solcher Ionenfluß, bzw. Strom, der durch eine sehr kleine, wenige  $\mu\text{m}^2$  große Fläche (Patch) der Membran fließt, gemessen werden. Bei diesen Messungen wird eine vorgegebene Spannung angelegt und über die Dauer des Experiments konstant gehalten (clamp). Betrachtet man den Verlauf des Stromes, so sieht man abrupte Sprünge: die Kanäle öffnen und schließen sich. Der gemessene Strom liegt in der Größenordnung von einigen Picoampere (pA).

Im Wesentlichen unterscheidet man drei mögliche Patch-Clamp-Konfigurationen (Abb. 5):

a) „Cell attached“:

Eine Pipette wird auf die Zelle aufgesetzt und ein leichter Unterdruck erzeugt. Hierbei bleibt die Zelle intakt.

b) „Whole cell“:

Es wird ein stärkerer Unterdruck erzeugt oder ein kurzer Spannungspuls angelegt, durch den die Membran durchbrochen wird. Hierbei steht die gesamte Zelle mit der Pipette in Verbindung und der Strom, der durch die gesamte Membranoberfläche der Zelle fließt, kann gemessen werden.

c) „Excised Patch“:

Bewegt man die Pipette nach dem Durchbrechen der Membran gleichmäßig nach oben, bleibt nur ein Stück der Membran (Patch) an der Pipettenspitze hängen.

Ist die cytoplasmatische Seite des „Patches“ zur Badlösung exponiert, bezeichnet man dies als Inside-Out-Konfiguration.

Liegt aber die Außenseite des „Patches“ zur Badlösung hin, bezeichnet man dies als „Outside-Out“-Konfiguration.

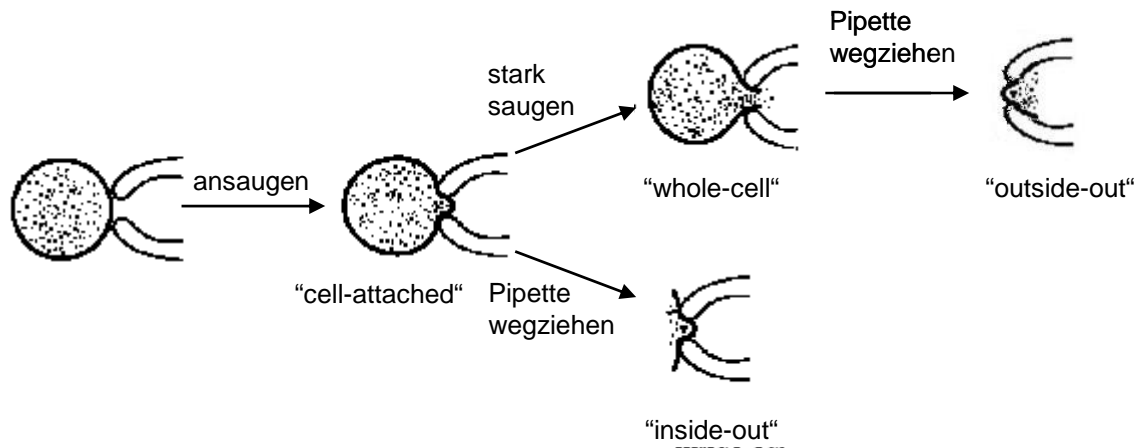


Abbildung 5: Patch-Clamp-Konfiguration nach Hamill et al., 1981

Für diese Arbeit wurde die Outside-Out-Konfiguration am excised Patch gewählt.

#### 2.2.2.1 Durchführung der Patch-Clamp-Experimente

Für die Experimente wurde eine Petrischale mit stabil transfizierten HEK 293 Zellen aus dem Brutschrank entnommen. Das Nährmedium wurde dekantiert und durch ECS-Lösung mit folgenden Konzentrationen ersetzt: NaCl 150 mM; KOH 5,6 mM; CaCl<sub>2</sub> 1,8 mM; MgCl<sub>2</sub> 1 mM; HEPES 10 mM; D-Glukose 20 mM (sonst nicht in ECS enthalten); pH 7,4.

Sowohl die Pipettenelektrode, als auch die Badelektrode bestehen aus Silberdrähten (Ag 15 W). Diese wurden in einer Natrium-Hypochloridlösung chloridiert, wobei der Farbwechsel von Silber nach Schwarz einer ausreichenden Chloridierung entspricht.

Die Patchpipetten wurden aus Borosilikat-Glaskapillaren hergestellt und mit Hilfe des Pipettenpullers in zwei Schritten so gezogen, dass sie nach dem anschließenden Poliervorgang einen Widerstand von 2,5-3,5 MΩ hatten. Die Pipetten wurden vor dem Experiment mit Intrazellulärlösung gefüllt, die folgenden Ionenkonzentrationen entsprach: KCl 140 mM; EGTA 10 mM; MgCl<sub>2</sub> 5 mM; HEPES 10 mM; pH 7,4.

Mit Hilfe des Mikromanipulators (siehe Abb. 6) konnte die Pipette nun manuell gesteuert auf die Zelle aufgesetzt werden. Durch Erzeugen eines leichten Unterdrucks wurde die Zellemembran an die Pipette gesaugt und es entstand ein sog. „Gigaseal“, d.h. ein Widerstand im Giga-Ohm-Bereich (1-4 GΩ), was dazu beiträgt, dass Leckströme auf ein Minimum reduziert werden.

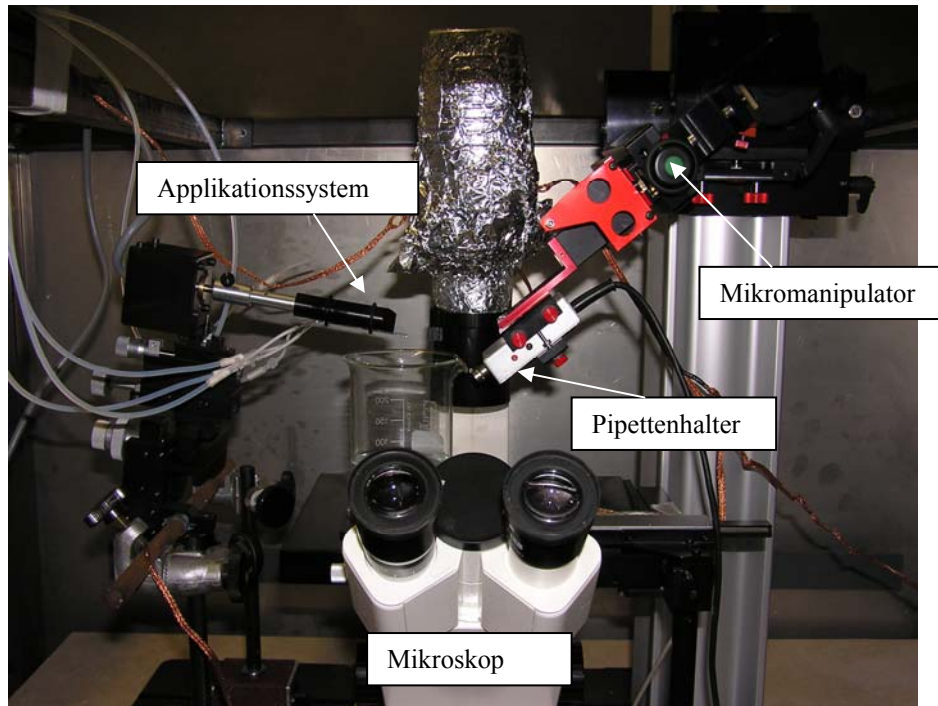


Abbildung 6: Aufbau der Meßapparatur

Ein Patch wurde mit Hilfe des Mikromanipulators vor das Applikationssystem positioniert, wo er je nach gewünschtem Experiment und dementsprechenden Parameterfile mit der notwendigen Lösung perfundiert wurde.

Das Applikationssystem, RSC 200, Biologic, wurde elektronisch gesteuert. Mittels Low-pass-Filter wurden die Daten gefiltert (1 kHz) und anschließend mit einem Digidata 1200 Analog/Digitalumwandler digitalisiert (2 kHz).

Eine optimale Stabilität des Patches wurde erreicht, indem das Membranpotential erst 200 ms vor der Serotoninapplikation von 0 mV auf -100 mV geklemmt und nach der Agonistenapplikation wieder auf 0 mV gesenkt wurde. Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

### 2.2.2.2 Applikationssystem (RSC 200)

Das Lösungsapplikationssystem ermöglicht einen Austausch der Lösungen innerhalb von weniger als 2 ms. Um einen Verlust von lipophilen Substanzen in Kunststoff zu vermeiden, besteht das Perfusionsystem hauptsächlich aus Polytetrafluorethylen-schläuchen (Teflon), welche sich durch ihre inerten Eigenschaften gegenüber anderen chemischen Substanzen auszeichnen und so einen möglichen Konzentrationsverlust minimieren (Barann et al. 2000b). Über diese Schläuche gelangen die Perfusionslösungen aus den Glasreservoirs in die Applikationsröhrchen (Abb. 7).

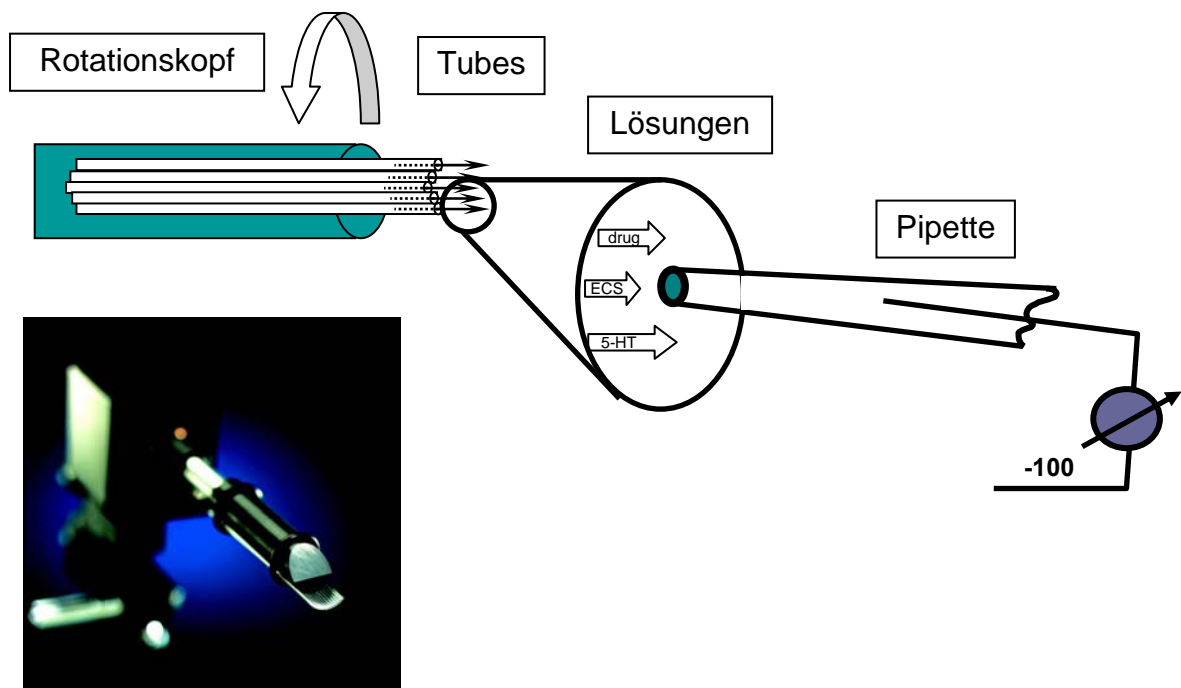


Abbildung 7: Applikationssystem nach Walkembach, 2005

Um einen optimalen Lösungsaustausch zu gewährleisten und zu verhindern, dass der Patch während des Experiments ungewollt mit der Badlösung in Kontakt kommt, wurden die „tubes“ am Rotationskopf möglichst dicht nebeneinander angebracht und es wurde darauf geachtet, dass beim Lösungswechsel nie ein „tube“ übersprungen wurde. Die Steuerung des Rotationskopfes erfolgte computergestützt.

### 2.2.2.3 Lösungsapplikation

Mit den „Parameterfiles“ des Steuerungsprogramms RSC V1.04 wurden die Bedingungen für den Lösungsaustausch festgelegt und gesteuert. Für die verschiedenen Experimente



wurden verschiedene Parameterfiles programmiert, damit immer ein möglichst optimaler Lösungsaustausch gewährleistet war.

Bei allen Experimenten diente ein Strom, der durch 30  $\mu$ M Serotonin (5-HT) induziert werden konnte, als Kontrolle.

Folgende Lösungsapplikationsprotokolle wurden in dieser Arbeit verwendet:

1. Konzentrations-Wirkungskurven:

Die Erstellung einer Konzentrations-Wirkungskurve dient dazu, einzuschätzen, ob eine Substanz einen Effekt auf den 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor hat oder diesen unbeeinflusst lässt.

Eine Konzentrations-Wirkungskurve lässt sich für drei verschiedene Applikationsarten erstellen.

- (1) *Kontinuierliche Applikation* (++) : 60 s vor und während der 5-HT Gabe;
- (2) *Offenkanal-Applikation* (-+) : Applikation der Testsubstanz ausschließlich während der 5-HT Applikation;
- (3) *Geschlossenkanal-Applikation* (+-) : Applikation der Testsubstanz ausschließlich 60 s vor der Serotoninapplikation

2. Einwaschexperimente:

Die Einwaschexperimente dienten dazu, die Kinetik der einzelnen Substanzen am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor besser bestimmen zu können und entsprechen einer kontinuierlichen Applikation. Hierbei wird jedoch die Vorapplikationszeit variiert, um zu überprüfen, wie schnell ein induzierter Effekt vollständig zum Tragen kommt. Die Zeitintervalle entsprachen:

32 ms, 50 ms, 100 ms, 300 ms, 1 s, 3 s, 10 s und 60 s.

Die kürzeste Einwaschzeit von 32 ms musste gewählt werden, da die Drehkopfgeschwindigkeit, d. h. der Wechsel von „tube“-Mittelpunkt zu „tube“-Mittelpunkt, auf 30 ms festgelegt wurde. Im System ist vorgegeben, dass die kürzeste Einwaschzeit sich aus der Drehkopfgeschwindigkeit + 2 ms ergibt, da dadurch ein optimaler Lösungsaustausch erreicht wird.

3. Auswaschexperimente:

Die Auswaschexperimente dienten ebenfalls der Charakterisierung der Kinetik der verschiedenen Substanzen. Hierbei wurde eine Substanz für 60 s auf den Patch appliziert. Bevor dann ein Strom durch Serotonin induziert wurde, wurde der Patch

unterschiedlich lange mit ECS gespült, um zu prüfen, wie schnell ein induzierter Effekt, wieder ausgewaschen werden kann. Die Zeitintervalle entsprachen:

32 ms, 50 ms, 100 ms, 300 ms, 1 s, 3 s, 10 s und 60 s.

#### 4. Elektrolyt-/Konzentrationssprungexperimente:

Bei den Konzentrationssprungexperimenten wurde erst ein Strom mit 30  $\mu$ M 5-HT erzeugt und 50 ms später eine Lösung mit 50% iger Elektrolytkonzentration, bzw. mit einem Anästhetikum appliziert.

Diese Experimente dienten dazu - im Falle der 50% igen Elektrolytlösung - die Geschwindigkeit des Applikationssystems zu testen, bzw. - im Falle der Lösung mit Anästhetikum - zu prüfen, ob der durch das Anästhetikum erzeugte Effekt innerhalb eines kürzeren Zeitintervalls als 32 ms einsetzt.

Der Beginn des Sprungs, also die Applikation der 50% igen Elektrolytlösung oder des Anästhetikums, wurde im Folgenden immer durch einen Pfeil verdeutlicht.

### 2.2.2.4 Datenanalyse

#### 1. Software:

Alle Stromspuren wurden digitalisiert (Digidata 1200, Axon Instruments, Foster City, CA, USA) und gespeichert. Die Datenanalyse wurde mit dem Programm Clampfit<sup>®</sup> durchgeführt und die Graphiken mit der GraphPad Prism<sup>®</sup> Software erstellt.

#### 2. Stromspurenanalyse:

##### a) Maximalamplitude (Peak)

Der Peak wurde mittels eines „Cursors“ (siehe Abb. 8:) in pA abgelesen.

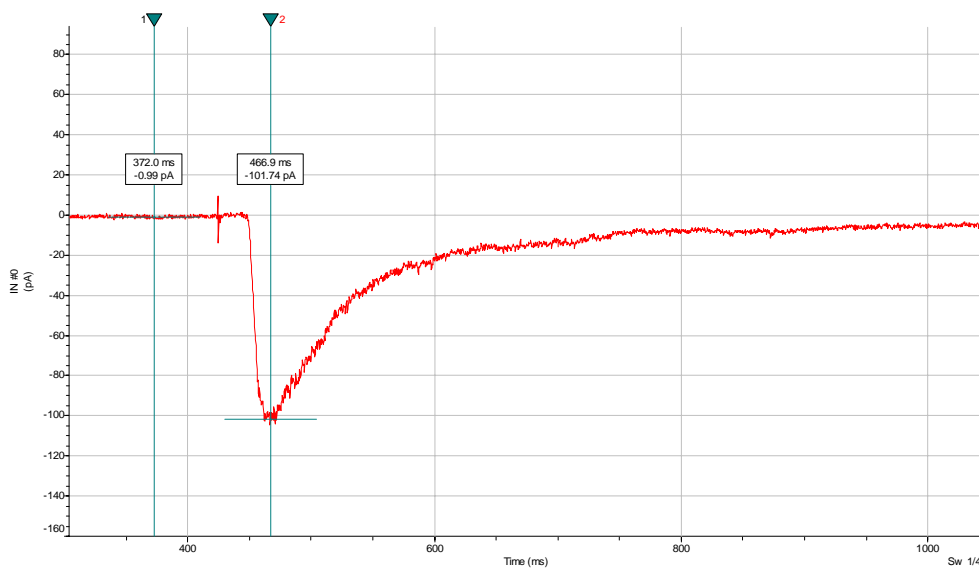


Abbildung 8: Exemplarische Stromspur: mittels des „Cursors“ (1,2) kann der Peak abgelesen werden

Der aus drei Messungen am selben „Patch“ gemittelte Peak wurde prozentual zu dem aus drei Kontrollmessungen gemittelten Peak angegeben (% des 5-HT induzierten Stroms  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes, S.E.M) und in eine Prism-Tabelle eingeben. Die Effekte (z.B. die Hemmung) wurden gegen die Konzentration des entsprechenden Anästhetikums aufgetragen. Eine so entstandene Konzentrations-Wirkungskurve wurde nach einer in Prism vorhanden Gleichung gefittet. Bei einer einfachen Konzentrationswirkungsbeziehung wurde folgende Funktion verwendet, welche eine sigmoidale Konzentrations-Wirkungsbeziehung mit variablem Slope beschreibt:

$$y = \text{bottom} + \frac{(\text{top} - \text{bottom})}{1 + 10^{(\log \text{EC50} - x) * \text{Hillslope}}}$$

Diese Konzentrations-Wirkungsbeziehung wurde folgendermaßen graphisch dargestellt und ihre jeweiligen Fitparameter konnten bestimmt werden.

a)

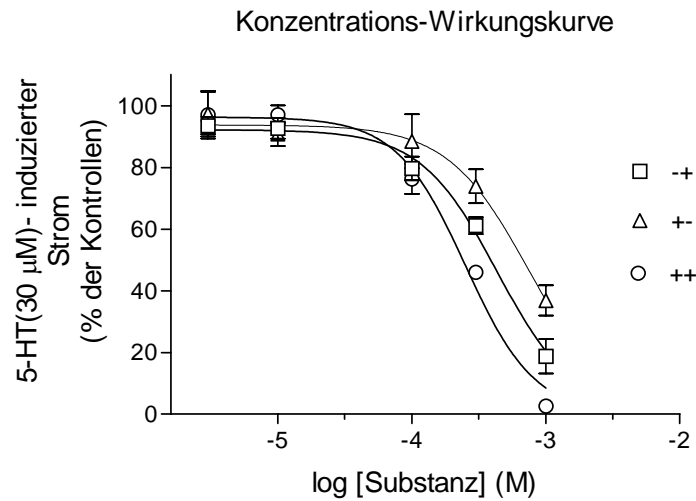


Abbildung 9: a) Beispiel einer Konzentrations-Wirkungskurve (Mittelwerte  $\pm$  SEM); Kreis: ++ Applikation, Dreiecke: +-, Quadrate: -+ Modus; Kontrolle: 30  $\mu$ M 5-HT, b) Fitparameter. Bottom = niedrigster Wert; Top = höchster Wert; LogEC<sub>50</sub> = Logarithmus des halbmaximaler Effektes ; Hillslope = Steigung; EC<sub>50</sub> = halbmaximaler Effekt.

Konnte die Konzentrations-Wirkungsbeziehung nicht durch jene Funktion erfasst werden, wurde folgende Gleichung unter der Annahme, daß mehrere Bindungsstellen vorhanden sein müssen, genutzt:

$$y = \text{SPAN} = - \text{bottom} + \text{top}$$

$$\text{Part 1} = \text{Span} * \frac{1}{1 + 10^{(\log \text{EC50}(1) - x) * \text{Hillslope 1}}}$$

$$\text{Part 2} = \text{Span} * \frac{1}{1 + 10^{(\log \text{EC50}(2) - x) * \text{Hillslope 2}}}$$

$$y = \text{bottom} + \text{PART 1} + \text{PART 2}$$

bottom = y - Wert der Minimalantwort

EC<sub>50</sub> = Konzentration, die eine halbmaximale Antwort hervorruft

Hillslope = Hill Koeffizient

top = y - Wert der Maximalantwort

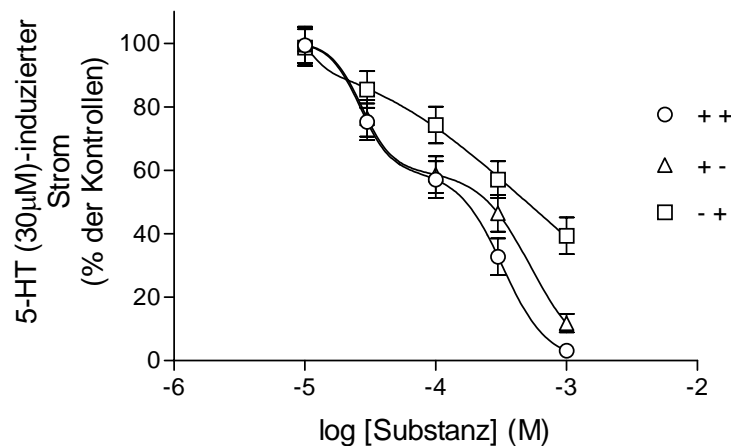
x = Logarithmus der Substanzkonzentration in  $\mu\text{M}$

y = Stromantwort

Span = Synonym für Amplitude

So konnten biphasische Konzentrations-Wirkungsbeziehungen dargestellt und klar mittels ihrer Fitparameter beschrieben werden:

a)



b)

	++	+-	-+
Best-fit values			
SPAN	100.5	100.6	108.6
BOTTOM (Constant)	0.0	0.0	0.0
TOP (Constant)	100.0	100.0	100.0
FRACTION1	0.4085	0.4063	0.07379
LOGEC50_1	-4.577	-4.565	-4.931
HILLSLOPE1	3.684	3.661	7.112
LOGEC50_2	-3.488	-3.276	-3.313
HILLSLOPE2	2.572	2.206	0.6306

Abbildung 10: a) Beispiel einer biphasischen Konzentrations-Wirkungskurve (Mittelwerte  $\pm$  SEM); Kreis: ++ Applikation, Dreiecke: +-, Quadrate: -+ Modus; Kontrolle: 30  $\mu\text{M}$  5-HT, b) dazugehörige Fitparameter: Bottom = niedrigster y-Wert; Top = höchster y-Wert; Fraction 1 = % des Gesamteffektes; LogEC<sub>50</sub> 1 = halbmaximaler Effekt der Fraction 1; Hillslope 1 = Steigung des 1. Effektes; LogEC<sub>50</sub> 2 = halbmaximaler Effekt der Fraction 2; Hillslope 2 = Steigung des 2. Effektes; Fraction 2 = 100 - Fraction 1.

Bei den Einwasch- bzw. Auswaschexperimenten, wurde der Prozentwert des durch 30  $\mu\text{M}$  5-HT induzierten Stroms gegen die Einwasch- bzw. Auswaschzeit in einer Prism-Tabelle eingetragen. Diese graphisch erfassten Kinetiken konnten ebenfalls gefittet und so deren Zeitkonstanten ermittelt werden (Abb. 11).

Zur Berechnung der Einwaschkinetikzeitkonstanten wurde folgende Funktion verwendet:

$$y = Y_{\text{max}1} \cdot \exp(-K1 \cdot X) + (100 - Y_{\text{max}1} - \text{Plateau}) \cdot \exp(-K2 \cdot X) + \text{Plateau}$$

Zur Berechnung der Auswaschkinetikzeitkonstanten wurde folgende Funktion verwendet:

$$y = Y_{\text{max}1} \cdot (1 - \exp(-K1 \cdot X)) + (100 - Y_{\text{max}1} - \text{Plateau}) \cdot (1 - \exp(-K2 \cdot X)) + \text{Plateau}$$

$y$  = Stromantwort

$Y_{\text{max}1}$  = maximale Antwort des 1. Effekts

$Y_{\text{max}2}$  = maximale Antwort des 2. Effekts

$K1$  = Konstante, mit der 1. Effekt abläuft

$K2$  = Konstante, mit der 2. Effekt abläuft

Plateau = Wert, der Effekt 1 von Effekt 2 trennt (d.h. Effekt 1 ist abgeschlossen)

Beispiel für alle in dieser Arbeit beschriebenen Einwasch- und Auswaschexperimente:

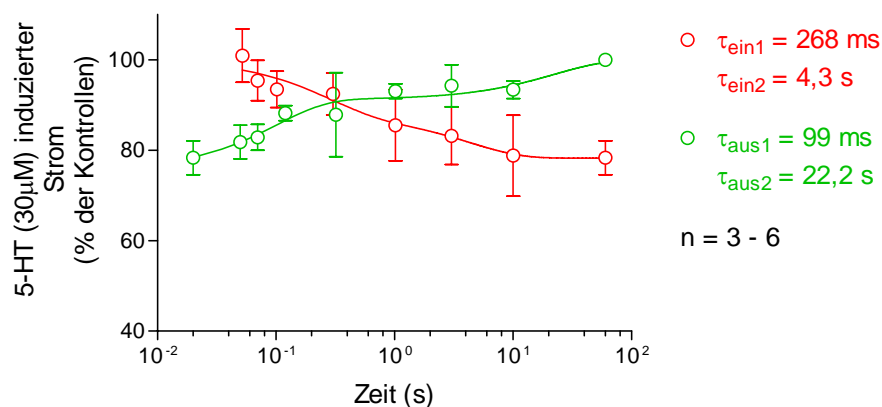


Abbildung 11: Beispiel für Einwasch und Auswaschexperimente, rot = Einwasch, grün = Auswasch, (Mittelwerte  $\pm$  SEM);  $\tau_{\text{ein}1}$  = schnelle Zeitkonstante,  $\tau_{\text{ein}2}$  = langsame Zeitkonstante des Einwaschs;  $\tau_{\text{aus}1}$  = schnelle Zeitkonstante,  $\tau_{\text{aus}2}$  = langsame Zeitkonstante

b) Integral:

Mit Clampfit konnte auch die integrierte Fläche über der Stromkurve berechnet werden. Diese Fläche entspricht der durch die geöffneten Kanäle fließenden Strommenge und kann ebenfalls prozentual zu den jeweiligen Kontrollstromspuren angegeben und zur Erstellung von Konzentrations-Wirkungskurven genutzt werden.

c) Zeitkonstanten: Aktivierungs- ( $\tau_{\text{akt}}$ ) und Inaktivierungszeitkonstanten ( $\tau_{\text{des}}$ ) sowie Zeitkonstanten der Konzentrations- und Elektrolytsprünge

Alle Zeitkonstanten wurden mit folgender Standard-Exponentialfunktion gefittet:

$$f(t) = \sum_{i=1}^n A_i e^{-t/\tau_i} + C$$

A = Amplitude der Funktion, berechnet ab dem gewählten Startpunkt der Kurvenanpassung

C = Konstanter Steady-State Strom

n = 1 für monoexponentielle (Abb. 12) und n = 2 für biexponentielle (Abb. 13)

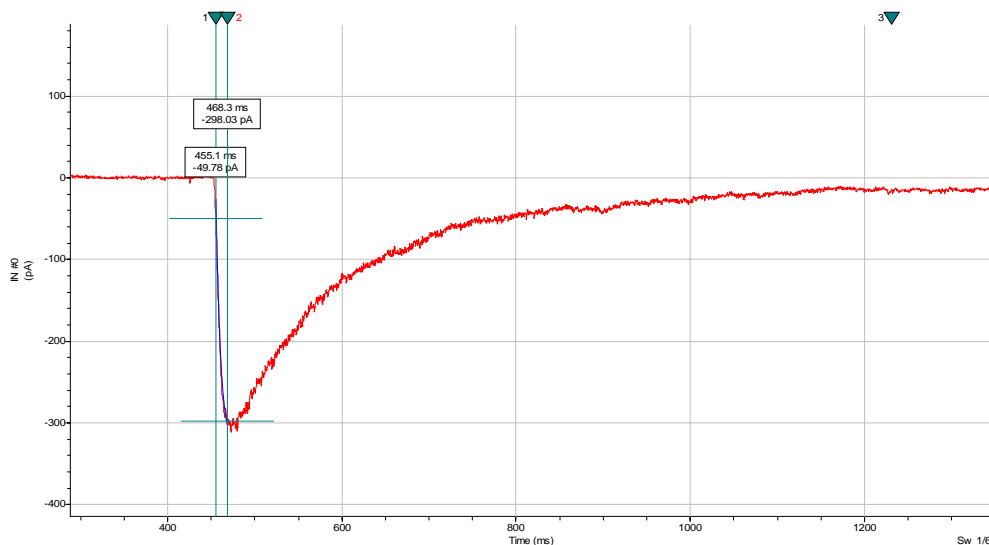
Berechnungen

t = Zeit

$\tau$  = Zeitkonstante

## Monoexponentielle Bestimmung der Zeitkonstanten:

## a)



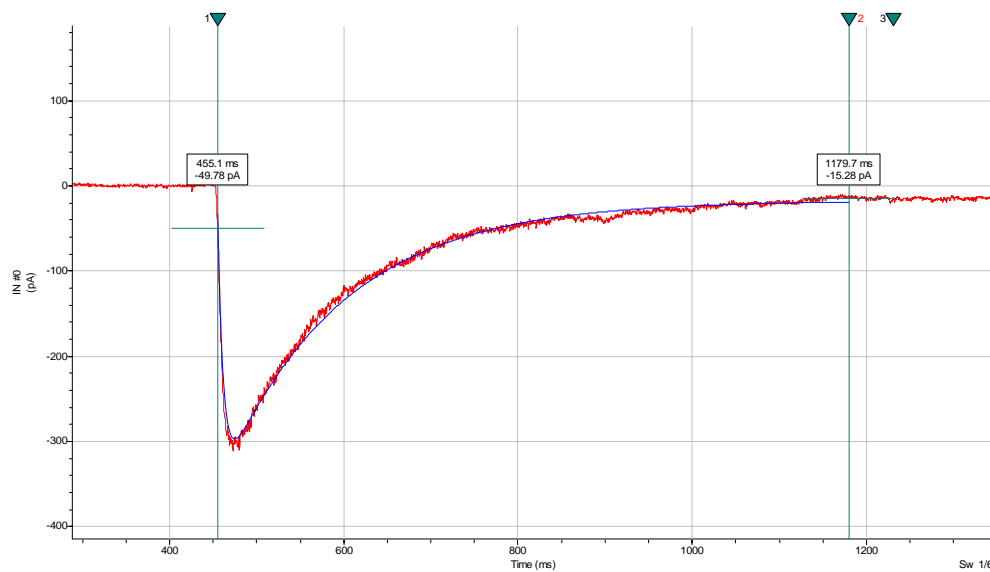
b)

Parameters		Statistics	
Function/Method			
Function	= Exponential, standard	Number of terms	= 1
Method	= Chebyshev	Power a	= n/a
Minimization	= n/a	Power b	= n/a
Weighting	= n/a	Temperature	= n/a
Num params	= 3	Valence	= n/a
General		Maximum Likelihood	
Precision	= n/a	Log likelihood estimate	= n/a
Free parameters	= 3	Schwartz criterion	= n/a
Number of iterations	= n/a	Levenberg-Marquardt	
Correlation coefficient	= 0.939	Goodnes of fit	= n/a
Standard deviation	= 9.03965	Parameters converged	= n/a
Sum of squared errors	= 4249.2	Number derivative calls	= n/a
Sum of data squared	= 1154910	Number of SSE calls	= n/a
Number of points	= 53	Times lambda increased	= n/a
Fitting area	= 1701.88		

Abbildung 12: a) Exemplarische Stromspur: „Cursorstellung“ (1, 2) bei mono-exponentieller Bestimmung von  $\tau_{akt}$ ; b) dazugehörige Statistik.

Biexponentielle Bestimmung der Zeitkonstanten:

a)



b)

Parameters		Statistics	
Function/Method			
Function	= Exponential, standard	Number of terms	= 2
Method	= Chebyshev	Power a	= n/a
Minimization	= n/a	Power b	= n/a
Weighting	= n/a	Temperature	= n/a
Num params	= 5	Valence	= n/a
General		Maximum Likelihood	
Precision	= n/a	Log likelihood estimate	= n/a
Free parameters	= 5	Schwartz criterion	= n/a
Number of iterations	= n/a	Levenberg-Marquardt	
Correlation coefficient	= 0.957	Goodnes of fit	= n/a
Standard deviation	= 3.28087	Parameters converged	= n/a
Sum of squared errors	= 30989.8	Number derivative calls	= n/a
Sum of data squared	= 1.70737e7	Number of SSE calls	= n/a
Number of points	= 2880	Times lambda increased	= n/a
Fitting area	= 38280.1		

Abbildung 13: a) Exemplarische Stromspur: „Cursorstellung“ (1, 2) bei biexponentiellen Fit zur Bestimmung von  $\tau_{akt}$  und  $\tau_{des}$ . b) dazugehörige Statistik.



### 2.2.3 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Beim Kontakt von Lösungen, die lipophile Anästhetika wie Propofol enthalten, mit Oberflächen von Reservoirs, „tubes“ oder Schläuchen kann es zu einem Konzentrationsverlust der lipophilen Komponente kommen. Deshalb wurden die Konzentrationen von Propofol und Isopropylphenol mittels HPLC bestimmt, um die jeweiligen Konzentrationen am Patch zu kennen. Die Proben wurden zweimal täglich entnommen.

Die HPLC - High performance liquid chromatography - ist ein Verfahren der Säulen-Flüssigkeit-Chromatographie. Sie stellt ein Trennverfahren dar, bei dem die Probenflüssigkeit mittels einer flüssigen Phase (Eluent) unter hohem Druck über die stationäre Phase (Trennsäule) transportiert wird.

Durchführung:

1000 µl der zu bestimmenden Proben (Propofol in ECS-Puffer) wurden in Glastubes gesammelt und bei -20° C gelagert.

Propofol sowie der interne Standard Thymol (10 mg/ml), welcher in Methanol gelöst war, wurde durch Flüssigkeitsextraktion isoliert. 50 µl interner Standard und 7 ml Cyclohexan wurden zu jeder Propofolprobe hinzugefügt, mit einem Inversionsmixer 20 min bei 40 UpM vermischt und anschließend 5 min zentrifugiert. Ca. 6 ml der organischen Phase wurden in Glastubes überführt und mit 100 µl Cyclohexanol vermischt. In einem Wasserbad wurde bei 37° C unter leichtem Nitrogenstrom die Verdampfung durchgeführt. Nach Zugabe von 200 µl der mobilen Phase, die aus 55 Teilen Acetonitril, 5 Teilen Isopropanol und 40 Teilen aqua bidest. besteht, konnte ein Aliquot dieser Lösung zur Bestimmung in das HPLC-System gespritzt werden.

Das HPLC-System war mit einem SCL-10A-System-Controller, einem LC-10AT-Liquid-Chromatograph, einem SIL-10AXL-Auto-Einspritzsystem und dem RF-10AXL-Fluoreszenz-detektor ausgestattet.

Als stationäre Phase wurde eine Supelcosil LC-8-DB-HPLC-Säule (25 cm\*4.6 mm, 5 µm) verwendet.

Gemessen wurde mit einer Excitationswellenlänge von 275 nm und einer Emissionswellenlänge 301 nm.

Ein typisches Chromatogramm (Abb. 14) sieht folgendermaßen aus:

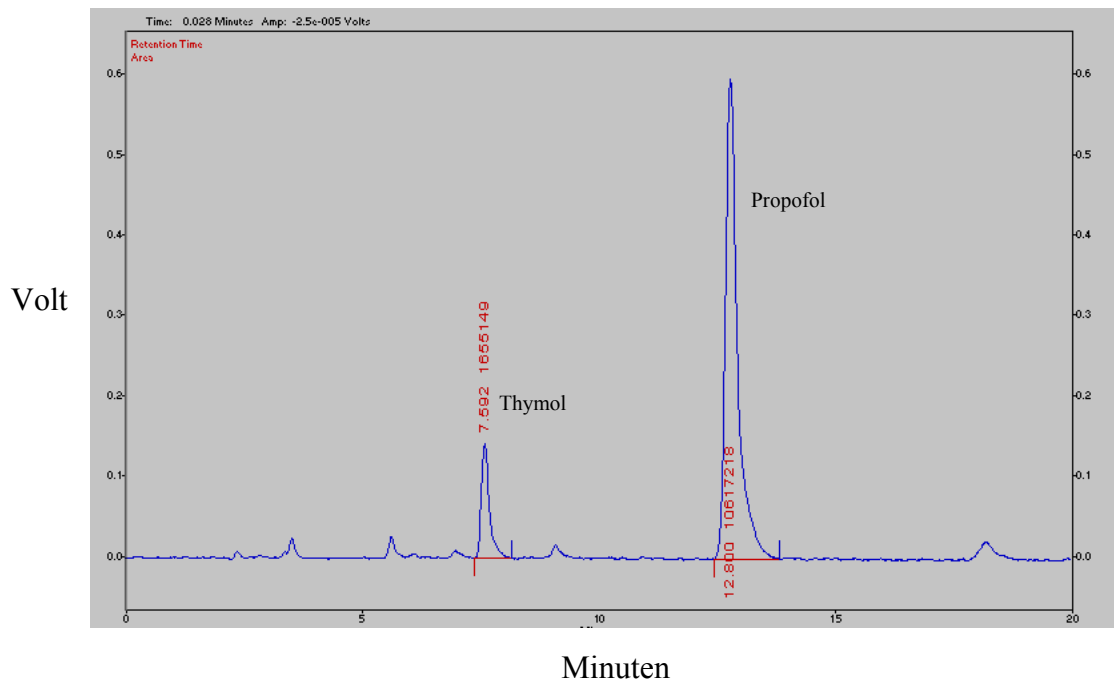


Abbildung 14: Typisches Chromatogramm einer Probe, die den internen Standard Thymol und Propofol enthält.

Die Eichgerade wurde erstellt, indem das Verhältnis der Peakhöhe von Propofol zu Thymol in Relation zu der jeweiligen Propofolkonzentration gesetzt wurde.

Die folgende Abbildung zeigt eine typische Eichkurve für Propofol:

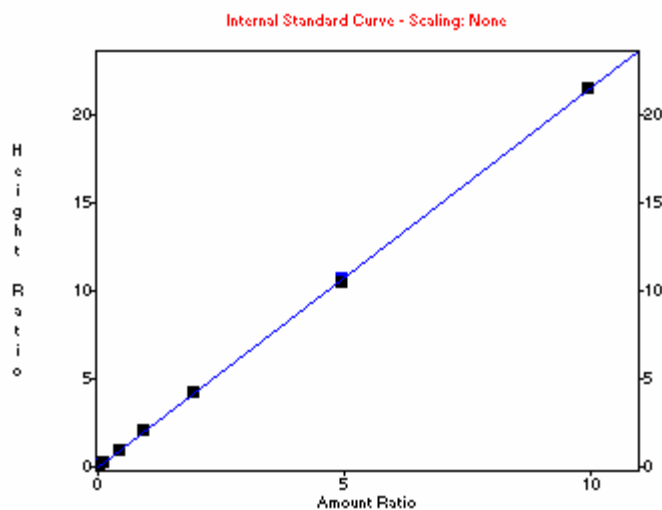


Abbildung 15: Eichkurve für Propofol

Die jeweiligen Konzentrationen der Testproben konnten nun mittels Regressionsparametern aus der Eichkurve bestimmt werden.

#### Datenanalyse:

Die HPLC-Signale wurden mit einem Shimadzu CLASS-VP-Chromatograph-Datensystem aufgenommen und analysiert. Die Datenpunkte in Abbildung 12 repräsentieren den Mittelwert einer Dreifachbestimmung, die an dem gleichen Meßtag durchgeführt wurde.

#### Ergebnisse:

1. In Abbildung 16 wurden die theoretischen Propofolkonzentrationen mit den gemessenen verglichen. Die finale Propofolkonzentration, d.h. die Konzentration die am Patch ankommt, unterschied sich von der theoretischen um ca. 50 %. Im folgenden wurden immer die finalen (gemessenen) Konzentrationen angegeben. Das obere Reservoir bezeichnet das Glasgefäß, indem die Lösung während der Experimente aufbewahrt wurde. „Unten“ entspricht dem Ende des „tubes“, wo die Lösung den Patch perfundiert.

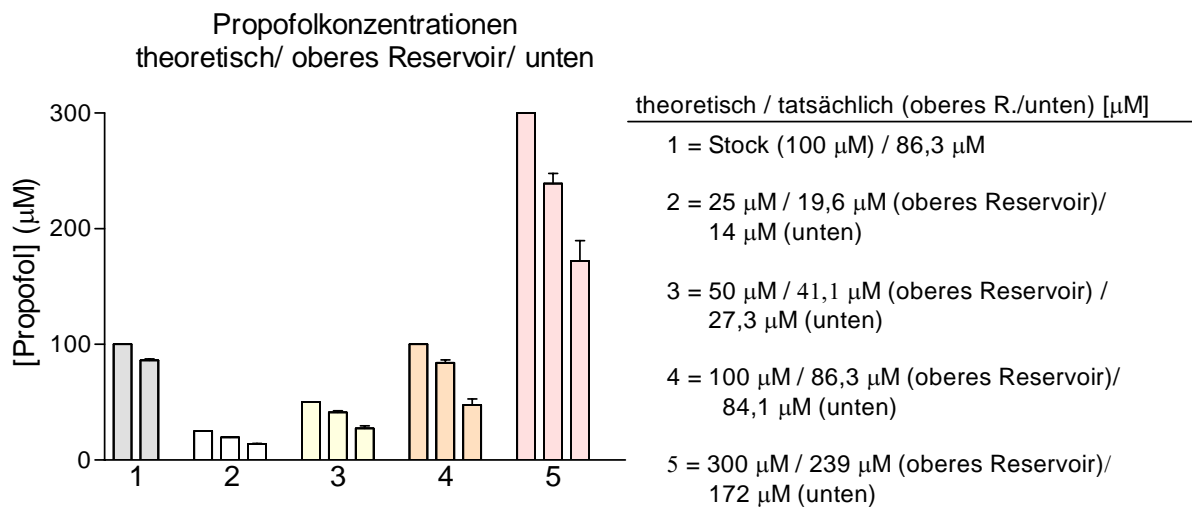


Abbildung 16: HPLC-Konzentrationsbestimmungen; Konzentrationsverlust im System (= theoretisch : oberes Reservoir : unten).

2. In Abbildung 17 wurden die theoretischen Isopropylphenolkonzentrationen mit den gemessenen verglichen. Es kam innerhalb des Systems zu einem Verlust von ca. 30 %. In den folgenden Abschnitten wurden immer die gemessenen Konzentrationen angegeben.

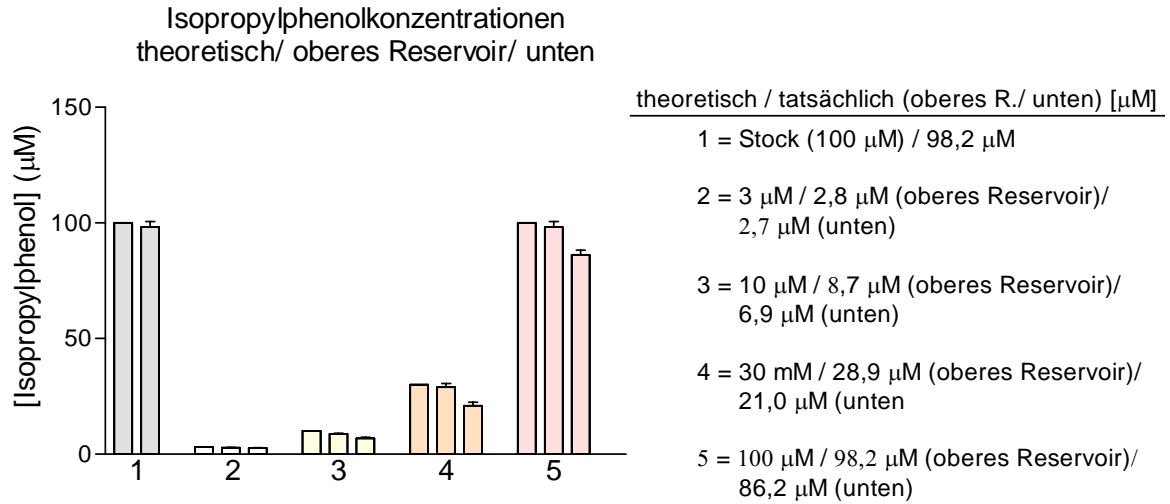


Abbildung 17: HPLC-Konzentrationsbestimmungen: Konzentrationsverlust im System (= theoretisch : oben : unten).

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Charakterisierung des Applikationssystems

Um sowohl das Lösungsapplikationssystem im Hinblick auf optimalen Lösungsaustausch, Flußrate und ungewollte Artefakte zu optimieren, als auch alle auftretenden Effekte richtig zu interpretieren, wurden erst Offenpipettenexperimente und dann mit optimierten Parametereinstellungen Experimente an „Patchen“ (Membranfragmenten) durchgeführt. Durch den Einwasch von Elektrolytlösungen unterschiedlicher Konzentrationen, lässt sich überprüfen, wie exakt der Lösungsaustausch einer Apparatur funktioniert.

Damit sollte gewährleistet werden, dass die Einstellungen der Apparatur für die jeweiligen Aufnahmen optimal sind. Außerdem lassen sich durch den direkten Vergleich dieser Experimente physiologische Membraneigenschaften von Artefakten unterscheiden. Z.B. kann eine auftretende Oszillation durch eine Veränderung in der Membran oder durch ein elektrisches Signal der Apparatur bedingt sein.

Ein klar definierter Lösungsaustausch ist des Weiteren wichtig, um Zeitkonstanten von Prozessen, die von einem Lösungsaustausch abhängig sind, richtig bestimmen zu können.

Die Offenpipettenexperimente zeigten, dass ein optimales Signal (Abb. 18) und damit ein optimaler Lösungsaustausch erreicht wird, wenn die Drehkopfgeschwindigkeit auf 30 ms eingestellt ist. Dabei erfolgte der Lösungsaustausch im Mittel bei  $n = 13$  innerhalb von 1,5 ms.

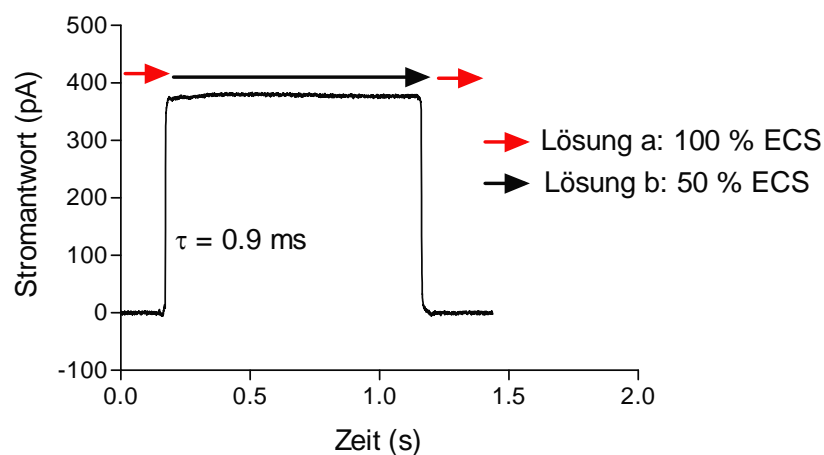


Abbildung 18: Exemplarisches Offenpipettenexperiment, Lösungsaustausch = 0,9 ms.

Die Elektrolytsprungexperimente (Abb. 19) zeigten, dass auch an der Membran ein solcher Lösungsaustausch bei optimierten Einstellungen stattfinden kann. 50 ms nach Applikation von Serotonin (5-HT) in 100 % ECS (Lösung a) wurde auf 5-HT in 50 % ECS (Lösung b) umgestellt, wodurch der Elektrolytsprung erzeugt wurde. Bei 30 Experimenten erfolgte der Lösungsaustausch im Mittel innerhalb von 1, 4 ms. D.h. der Lösungsaustausch findet am „Patch“ genauso schnell statt wie an der offenen Pipette.

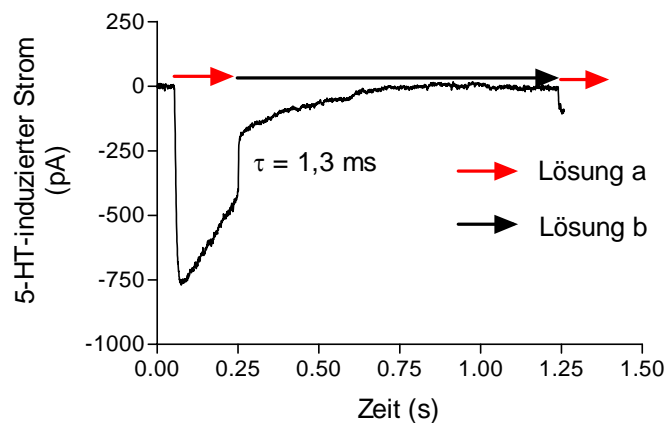


Abbildung 19: Exemplarische Stromspur eines Elektrolytsprungs, Dauer des Lösungsaustausch = 1,3 ms, Lösung a = 30  $\mu\text{M}$  5-HT in 100% ECS, Lösung b = 30  $\mu\text{M}$  5-HT in 50 % ECS.

Weiterhin wurde überprüft, ob es durch die Drehung des Rotationskopfes bei der Applikation der unterschiedlichen Lösungen zu einem Artefakt in der aufgenommenen Stromspur kommt.

Es wurden drei unterschiedliche Experimente durchgeführt:

1. 50 ms nach Applikation Wechsel von 5-HT auf ein benachbartes „Tube“ mit 5-HT (Abb. 20),
2. 50 ms nach Applikation Wechsel von 5-HT auf ein benachbartes „Tube“ mit ECS (Abb. 21).
3. In einem weiteren Experiment wurde die Applikation des 5-HTs unterbrochen (Abb. 22), ohne dass eine Drehkopfbewegung stattfand.

Es wurde festgestellt, dass die Drehung des Rotationskopfes eine leichte Oszillation in der Stromspur verursacht (Abb. 20 + 21). Deshalb wurde in weiteren Experimenten darauf geachtet, dass diese nicht mit substanzspezifischen Effekten verwechselt wurde.

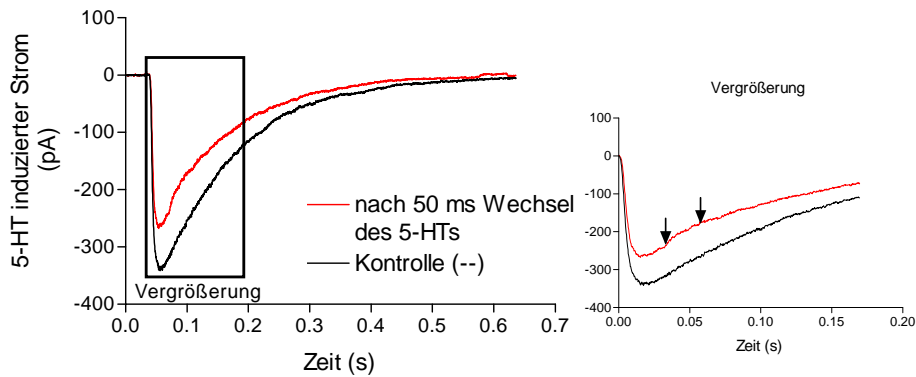


Abbildung 20: Exemplarische Stromspur bei der 50 ms nach 5-HT ( $30\ \mu\text{M}$ )-Applikation eine Drehkopfbewegung durch einen Wechsel von 5-HT auf ein benachbartes „tube“ mit 5-HT verursacht wurde.

Anmerkung: Das die Stromspuren in Abbildung 20 nicht ganz übereinander liegen, zeigt, dass ein leichter „Run down“ (spontaner Verlust von Kanälen) stattgefunden hat.

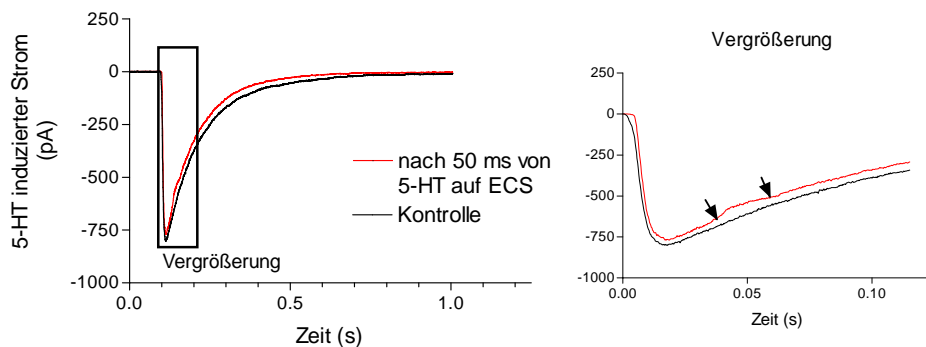


Abbildung 21: Exemplarische Stromspur, bei der 50 ms nach 5-HT ( $30\ \mu\text{M}$ )-Applikation eine Drehkopfbewegung durch einen Wechsel von 5-HT auf ECS verursacht wurde.

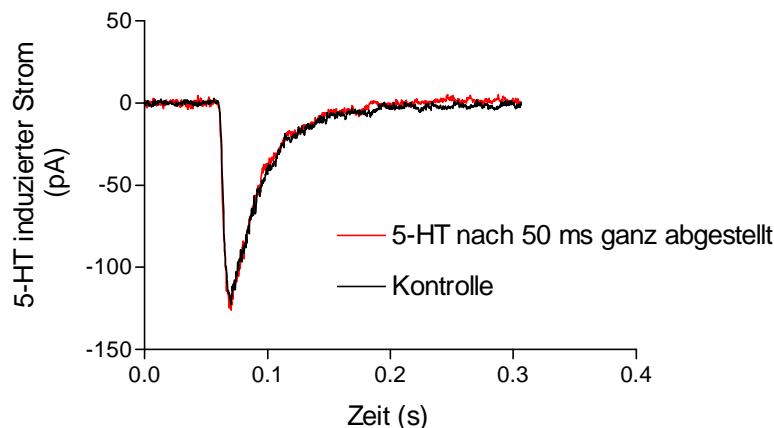


Abbildung 22: Exemplarische Stromspur, bei der keine Drehkopfbewegung durchgeführt wurde, 50 ms nach 5-HT ( $30\ \mu\text{M}$ )-Applikation wurde das Ventil abgestellt. Es wurde keine Veränderung der Desensibilisierung festgestellt.

Diese Experimente zeigten auch, dass eine einmalige, kurze Serotoninapplikation ausreichend ist, um den Vorgang der Aktivierung und anschließenden Desensibilisierung

des 5-HT<sub>3A</sub> Rezeptors auszulösen. Selbst wenn die 5-HT-Applikation nach 50 ms beendet wurde, zeigte diese Stromspur eine ähnliche Aktivierungs- und Desensibilisierungskinetik wie die Kontrollstromspur, bei der die 5-HT-Applikation fortgesetzt wurde (Abb. 22).

Die Reproduzierbarkeit der erlangten Ergebnisse an der Apparatur mit „Rapid-Solution-Exchange-System“ wurde gezeigt, indem eine Kohorte Experimente an einer anderen Apparatur mit dem gleichen System und Aufbau wiederholt wurden.



### 3.2 Grundcharakterisierung des 5-HT<sub>3A</sub> Rezeptors

#### 3.2.1 Agonisten- (5-HT-) Konzentrations-Wirkungskurve

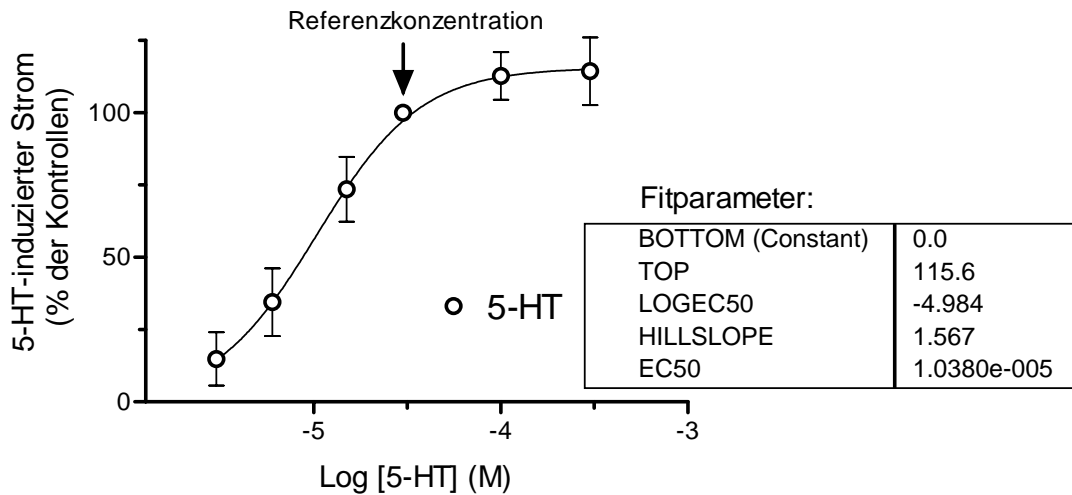


Abbildung 23: Konzentrations-Wirkungskurve (nach Walkembach, 2005),  $EC_{50} = 10,4 \mu\text{M}$ , Kontrolle:  $30 \mu\text{M}$  5-HT.

Die Konzentrations-Wirkungskurve für 5-HT an menschlichen 5-HT<sub>3</sub> Rezeptoren zeigte im Vergleich zu der Potenz von 5-HT an Maus 5-HT<sub>3</sub> Rezeptoren eine zweifach niedrigere Potenz (Barann et al. 2000a). Der Hillkoeffizient von 1.5 stimmt mit dem klassischen Model für die Aktivierung ligandengesteuerter Kanäle, bei dem für die Aktivierung zwei Agonistenmoleküle benötigt werden (Katz and THESLEFF 1957; Forman and Miller 1989; Peters et al. 1992) überein.

### 3.2.2 Aktivierungs- ( $\tau_{\text{akt}}$ ) und Desensibilisierungszeitkonstanten ( $\tau_{\text{des}}$ )

Die Aktivierungs- und Desensibilisierungszeitkonstanten wurden aus allen in diese Arbeit eingeflossenen Kontrollexperimenten gemittelt.

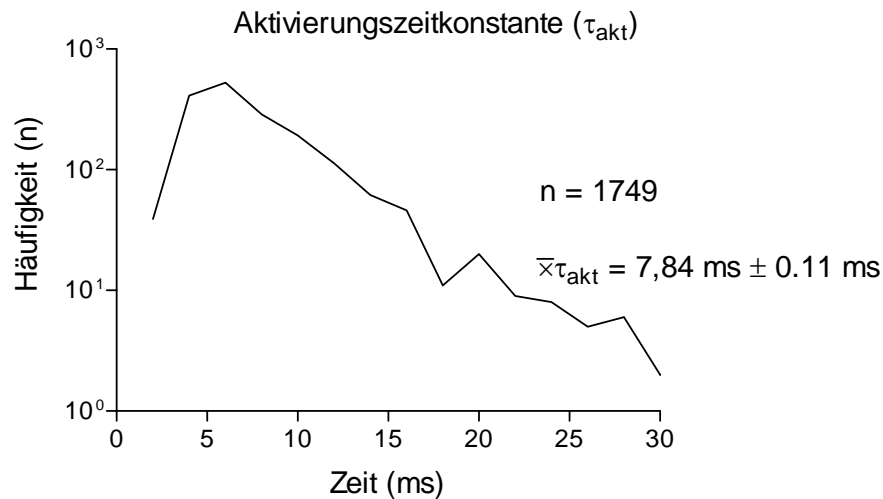


Abbildung 24: Aktivierungszeitkonstanten aller Kontroll-(30  $\mu\text{M}$  5-HT) experimente ( $n = 1749$ );  $\tau_{\text{akt}} = 7,84 \text{ ms} \pm 0,11 \text{ ms}$ .

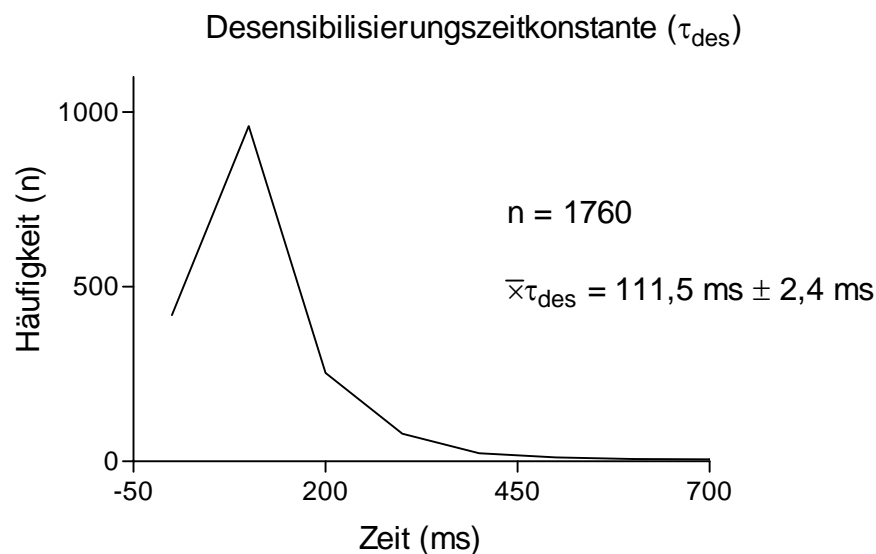


Abbildung 25: Desensibilisierungszeitkonstanten aller Kontroll-(30  $\mu\text{M}$  5-HT) experimente ( $n = 1760$ ),  $\tau_{\text{des}} = 111,5 \text{ ms} \pm 2,4 \text{ ms}$ .

Die Aktivierungszeitkonstante, gemittelt aus 1749 Experimenten beträgt:

$7,84 \text{ ms} \pm 4,7 \text{ ms} / 0,11 \text{ ms}$  (SEM), der Median liegt bei 6,4 ms;

die Desensibilisierungszeitkonstante, die aus 1760 Experimenten gemittelt werden konnte, beträgt:

$111,5 \text{ ms} \pm 100 \text{ ms} / 2,4 \text{ ms}$  (SEM), der Median liegt bei 83,5 ms.

Die Werte der Aktivierungszeitkonstante des 5-HT<sub>3A</sub> Rezeptors lagen bei anderen Veröffentlichungen im Bereich von 10-20 ms, die der Desensibilisierung bei 130 – 190 ms (Barann et al. 2000a).

### 3.2.3 Recovery

Um zu überprüfen, wie schnell es bei den 5-HT<sub>3A</sub> Rezeptoren zu einer Erholung (Recovery) von der Desensibilisierung kommt, wurden Doppelpulsexperimente durchgeführt. Bei diesen Experimenten wird die Zeit zwischen zwei 5-HT-induzierten Strömen zwischen fünf und sechzig Sekunden in fünf Sekundenabständen variiert. Die Erholung von der Desensibilisierung ist dann vollständig abgeschlossen, wenn die zweite Stromspur die erste überlagert und die Kinetik mit dieser übereinstimmt.

Gleichzeitig wurde überprüft, ob die Dauer der 5-HT Applikation für die Erholung eine Rolle spielt. Dafür wurde die Dauer des 5-HT Pulses auf 1,2 s bzw. auf 50 ms festgesetzt.

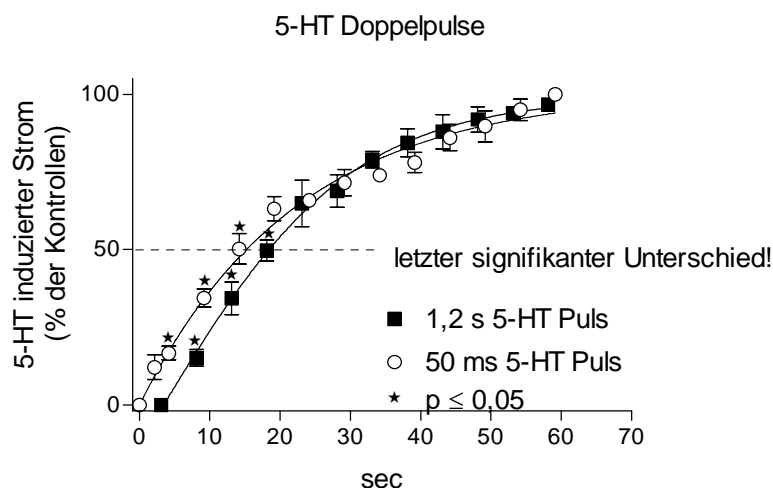


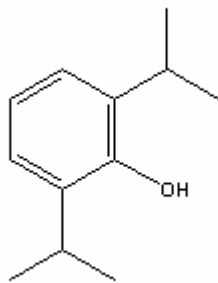
Abbildung 26: Erholung der Desensibilisierung, Dauer der 5-HT (30  $\mu$ M) Applikation 1.2 s versus 50 ms. \*  $p \leq 0,05$ , gepaarter t-test, basierend auf Absolutwerten.

Die Erholung von der Desensibilisierung war bei beiden Pulsen zwischen 15-20 s zu 50 % abgeschlossen. Deshalb wurde die Erholungs-/Spülzeit zwischen einzelnen Experimenten auf 60 s festgelegt. Die Pulslänge der 5-HT-Applikation hatte innerhalb der ersten 20 ms einen Einfluss auf die Erholung. Bei einer Applikationsdauer von 50 ms erfolgen die ersten 50 % der Erholung schneller als bei einer Applikationsdauer von 1,2 s, die weiteren 50 % der Erholung benötigten die gleichen Zeitkonstanten. Die Applikationsdauer wurde für die einzelnen Experimente immer zwischen 1,2-1,5 s festgelegt.

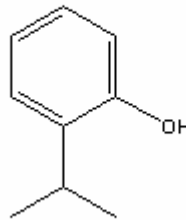
### 3.3 Effekte von Phenolderivaten am 5-HT<sub>3A</sub> Rezeptor

Die Untersuchung von Phenolderivaten war von Interesse, da das Phenolderivat Propofol ein im klinischen Gebrauch häufig angewandtes Anästhetikum ist. Es gilt als vorteilhafte Substanz, der eine antiemetische Wirkung zugeschrieben wird (McCollum et al. 1988; Borgeat et al. 1992; Reimer et al. 1993; Barann et al. 2000a).

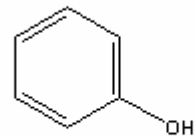
Es sollte überprüft werden, ob dieser antiemetische Effekt durch eine Hemmung des 5-HT<sub>3A</sub> Rezeptors bei klinischen Konzentrationen erklärbar ist. Um den molekularen Wirkmechanismus von Propofol am 5-HT<sub>3A</sub> Rezeptor zu identifizieren, wurden sowohl kinetische Experimente durchgeführt, als auch die Wirkung von Propofolderivaten am 5-HT<sub>3A</sub> Rezeptor charakterisiert. Folgende strukturähnliche Substanzen wurden untersucht:



Propofol



Isopropylphenol



Phenol

### 3.3.1 Konzentrations-Wirkungskurven von Propofol

Die Konzentrations-Wirkungskurven von Propofol wurden für die drei Applikationsarten (siehe Methodenteil Seite 19), die kontinuierliche Applikation (++), die Offenkanal-Applikation (-+) und die Geschlossenkanal-Applikation (+-) erstellt. Die +- und -+ Kurven konnten am besten durch sigmoidale, monoexponentielle Dosis-Wirkungsbeziehungen beschrieben werden, die ++ Konzentrations-Wirkungskurve wurde am besten durch eine biexponentielle Funktion erfasst (Abb. 27).

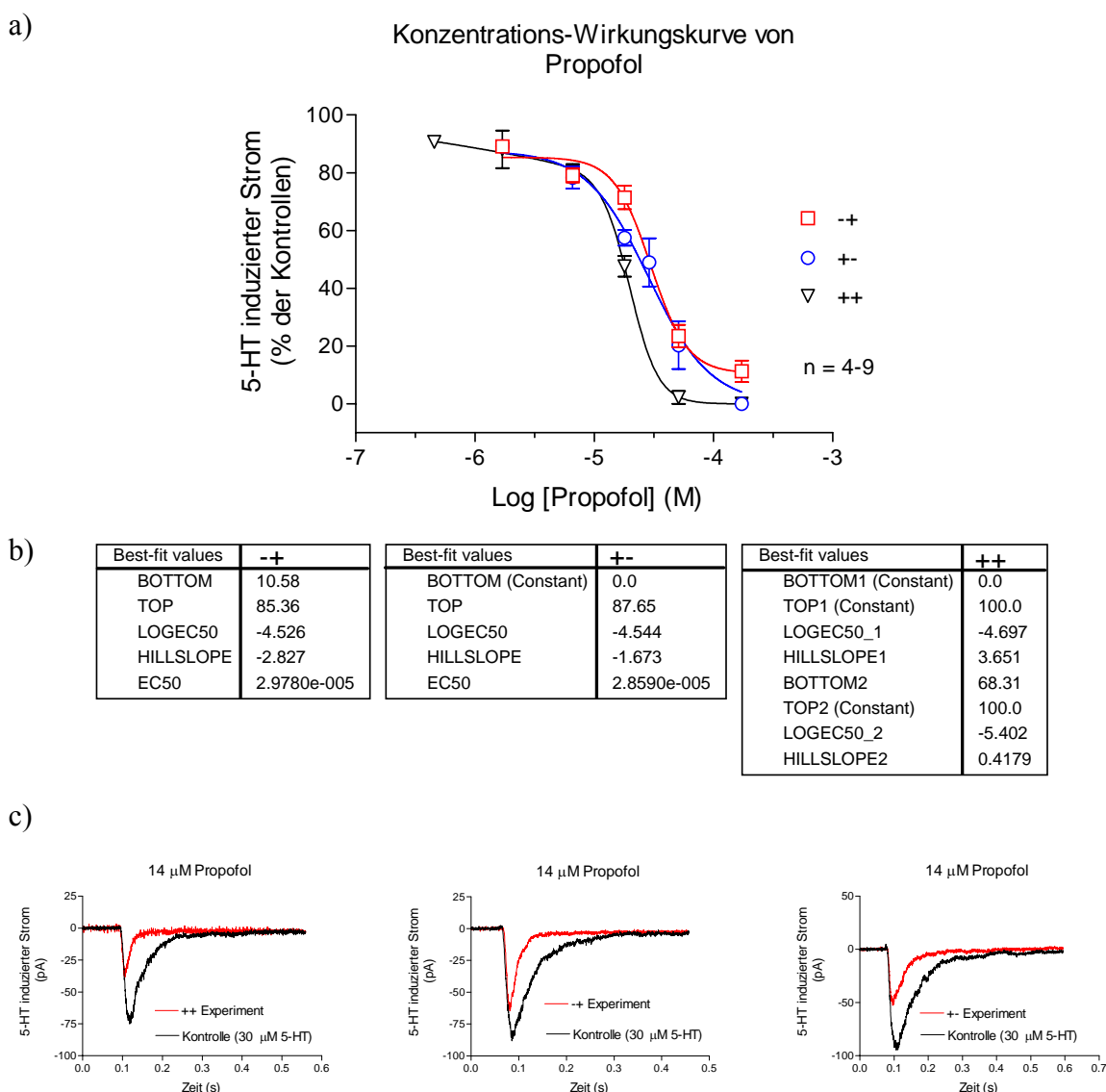


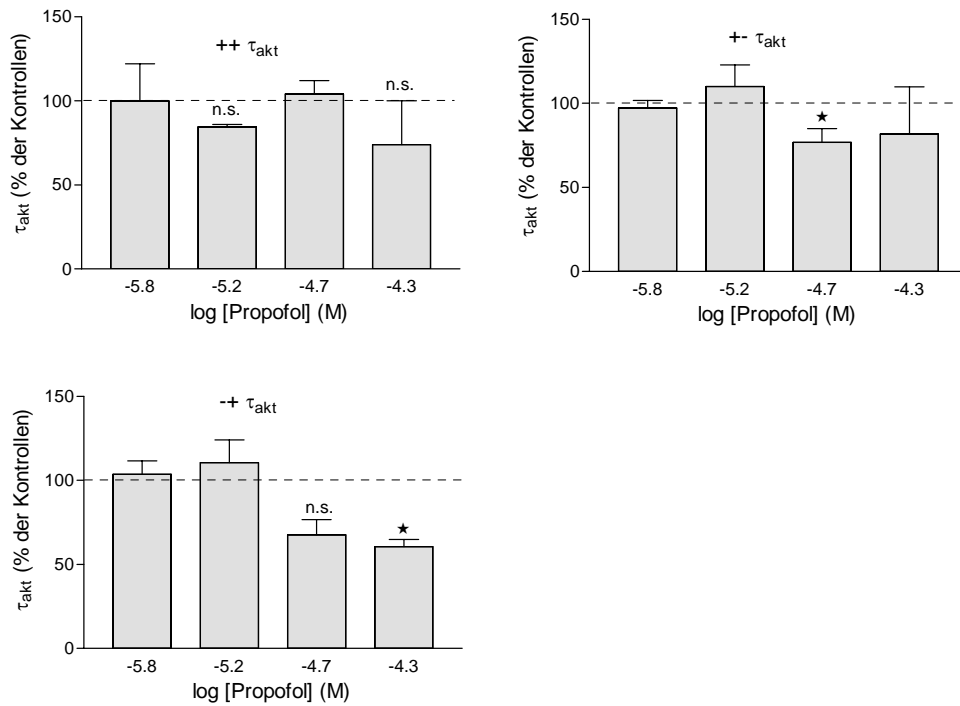
Abbildung 27: a) Konzentrations-Wirkungskurven von Propofol (Mittelwerte  $\pm$  SEM). Schwarz = ++ Applikation,  $IC_{50}(1) = 4 \mu M$ ,  $IC_{50}(2) = 22, 3 \mu M$ ; blau = +- Applikation,  $IC_{50} = 28, 6 \mu M$ ; rot = -+ Applikation,  $IC_{50} = 29, 8 \mu M$ ; b) Fitparameter für die einzelnen Applikationsmodi; c) Beispielstromspuren.

Nur durch Vorapplikation und die gemeinsame Applikation mit Serotonin kam es zu der maximal möglichen Inhibierung. Die  $IC_{50}$ -Werte dieser Inhibierung lagen bei 4  $\mu$ M bzw. 22,3  $\mu$ M für die ++ Applikation und bei jeweils ca. 30  $\mu$ M für die +- und die -+ Applikation.

Bei der ++ Applikation kam es zu einer konzentrationsabhängigen Beschleunigung der Desensibilisierungszeitkonstanten (Abb. 28). Dieser Effekt wurde auch bei der -+ Applikation erreicht, wohingegen bei der +- Applikation nur eine geringe und nicht konzentrationsabhängige Beschleunigung der Desensibilisierungszeitkonstanten erreicht werden konnte. D.h. im Falle der Desensibilisierungszeitkonstante scheint die -+ Applikation oder Offenkanalapplikation eventuell einen größeren Einfluss zu haben, oder es werden beide Applikationsarten benötigt, um den Maximaleffekt zu erreichen. Die Aktivierungszeitkonstanten blieben bei der ++ und +- Applikation unbeeinflusst, wohingegen sie bei der -+ Applikation bei hohen Konzentrationen beschleunigt wurden.

Um diese Effekte weiter differenzieren zu können, wurden Einwasch- und Auswasch-Experimente angeschlossen.

a)



b)

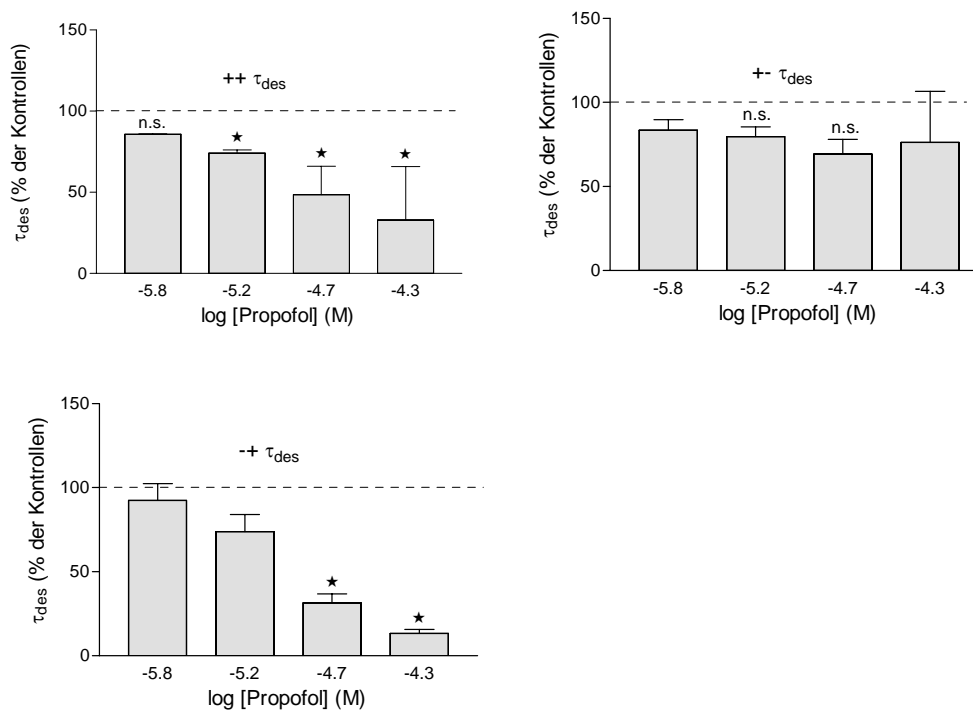


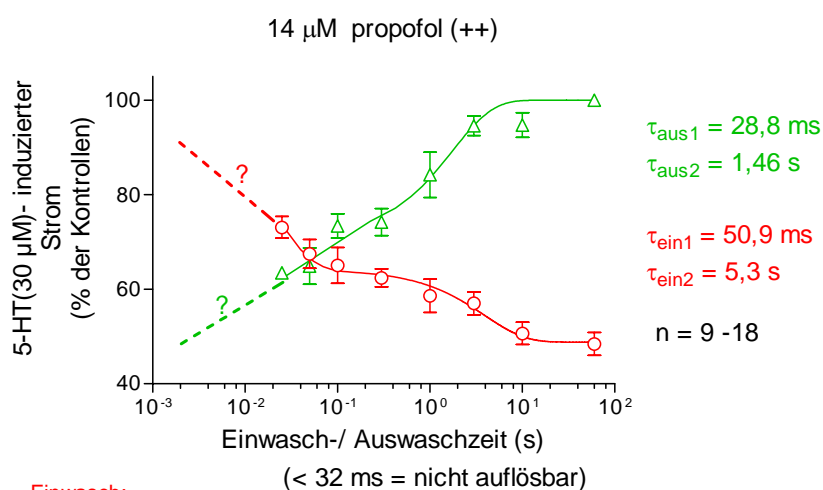
Abbildung 28: a) Konzentrationsabhängigkeit der Aktivierungs- und b) Desensibilisierungszeitkonstanten der verschiedenen Applikationsmodi (Mittelwerte  $\pm$  SEM). \* =  $p \leq 0,05$ , gepaarter t-test, basierend auf den Absolutwerten.

### 3.3.2 Einwasch und Auswasch von Propofol

Um einen ersten Eindruck über die Kinetik der Propofoleffekte zu bekommen, wurden bei dem  $IC_{50}$ -Wert die Ein- und Auswaschzeitkonstanten (Erläuterung in Material und Methoden) im ++ Applikationsmodus gemessen.

#### 3.3.2.1 ++ Einwasch/Auswasch

a)



b)

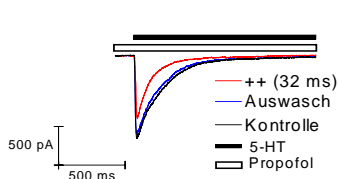
Einwasch:			
Best-fit values		95% Confidence Intervals	
YMAX1	15.32	YMAX1	9.719 to 20.91
K1	0.2540	K1	-0.08349 to 0.5914
PLATEAU	48.82	PLATEAU	44.37 to 53.26
K2	52.49	K2	28.31 to 76.66

Auswasch:			
Best-fit values		95% Confidence Intervals	
YMAX1	29.01	YMAX1	20.83 to 37.20
K1	0.5647	K1	0.1695 to 0.9599
PLATEAU	55.07	PLATEAU	24.31 to 85.83
K2	22.26	K2	-36.59 to 81.11

c)

Propofol wurde 32 ms vor und während des 5-HT Pulses appliziert



Propofol wurde 60 s vor und während des 5-HT Pulses appliziert

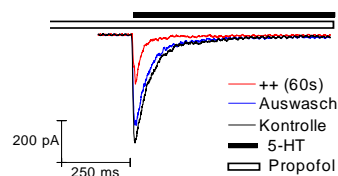


Abbildung 29: a) Einwasch (rot) und Auswasch (grün) von 14  $\mu$ M Propofol im ++ Modus (Mittelwerte  $\pm$  SEM). Kontrollen (30  $\mu$ M 5-HT). Die ersten 32 ms waren nicht auflösbar, danach waren die Effekte von der Vorapplikationszeit abhängig. Die Effekte wurden durch zwei Zeitkonstanten charakterisiert. b) Fitparameter für Einwasch und Auswasch c) Beispielstromspuren.



Sowohl der Einwasch, als auch der Auswasch wurden durch zwei Zeitkonstanten charakterisiert (Abb. 29), wovon eine im Millisekunden- ( $\tau_1$ ) und die andere im Sekundenbereich ( $\tau_2$ ) lag. Beide Prozesse waren von der Vorapplikationszeit abhängig. Da die kürzest mögliche Einwaschzeit 32 ms betrug und nach dieser Zeit schon ca. 25 % des ersten Effektes erreicht waren, wurden später Konzentrationssprungexperimente angeschlossen, die klären sollten, wie die Inhibierung in den ersten 32 ms vermittelt wird. Um den Einfluß der Vorapplikationszeit weiter zu differenzieren, wurde der Einwasch auch im +- Modus und bei unterschiedlichen Konzentrationen gemessen. Auch der Auswasch wurde bei diesen Konzentrationen bestimmt und mit dem +- Einwasch verglichen (Abb. 30 - 33).

### 3.3.2.2 +- Einwasch/Auswasch (5 $\mu$ M Propofol)

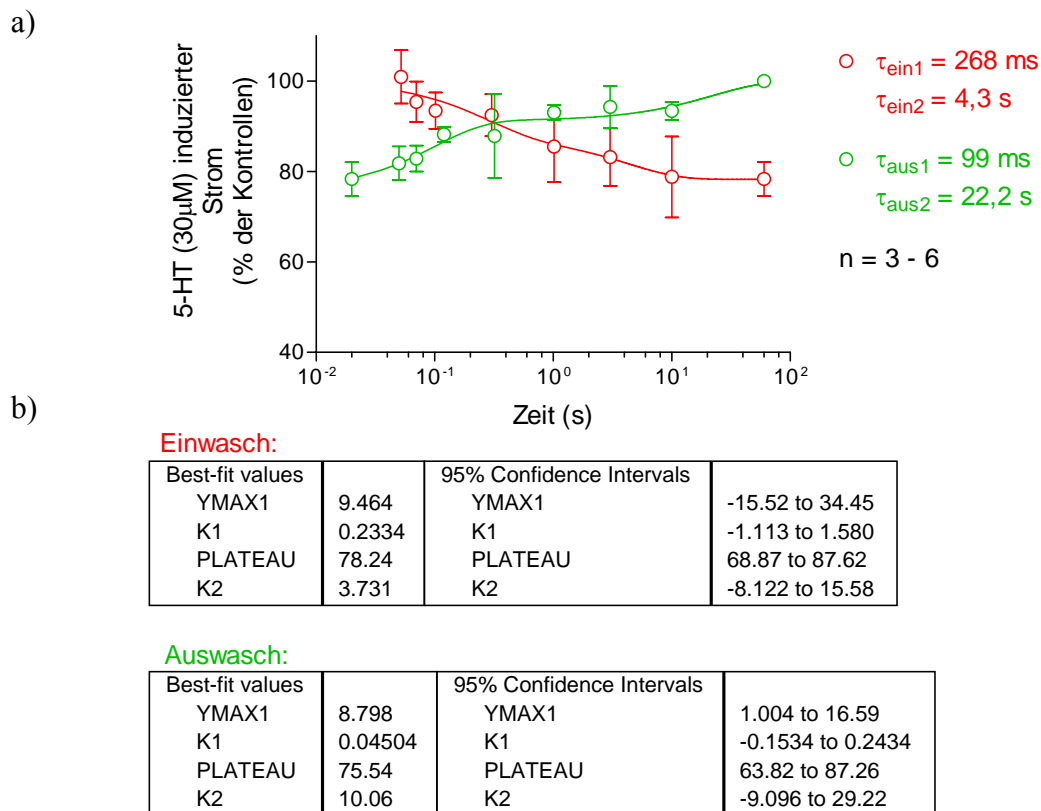
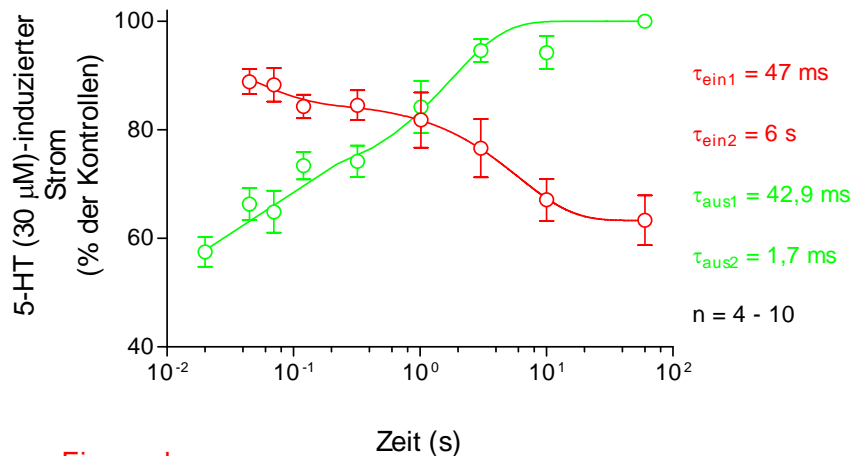


Abbildung 30: a) +- Einwasch und Auswasch von 5  $\mu$ M Propofol (Mittelwerte  $\pm$  SEM). Kontrolle (30  $\mu$ M 5-HT); Einwasch:  $\tau_{\text{ein1}} = 203$  ms,  $\tau_{\text{ein2}} = 3,6$  s; Auswasch:  $\tau_{\text{aus1}} = 99$  ms,  $\tau_{\text{aus2}} = 22,2$ s; b) Fitparameter für Ein- und Auswasch.

Auch bei einem Einwasch mit 5  $\mu$ M Propofol konnten zwei Effekte unterschieden werden. Diese konnten auch durch zwei Zeitkonstanten bestimmt werden, wovon wieder die erste im Milli- und die zweite im Sekundenbereich lag.

3.3.2.3 +/- Einwasch/Auswasch (14  $\mu$ M Propofol)

a)



b)

Einwasch:			
Best-fit values		95% Confidence Intervals	
SPAN1	21.86	SPAN1	11.91 to 31.82
K1	0.1669	K1	-0.05309 to 0.3870
SPAN2	11.23	SPAN2	-68.39 to 90.86
K2	21.26	K2	-119.2 to 161.8
PLATEAU	63.28	PLATEAU	56.85 to 69.70
Half-life_1	4.152	Half-life_1	-13.06 to 1.791
Half-life_2	0.03261	Half-life_2	-0.005813 to 0.004285

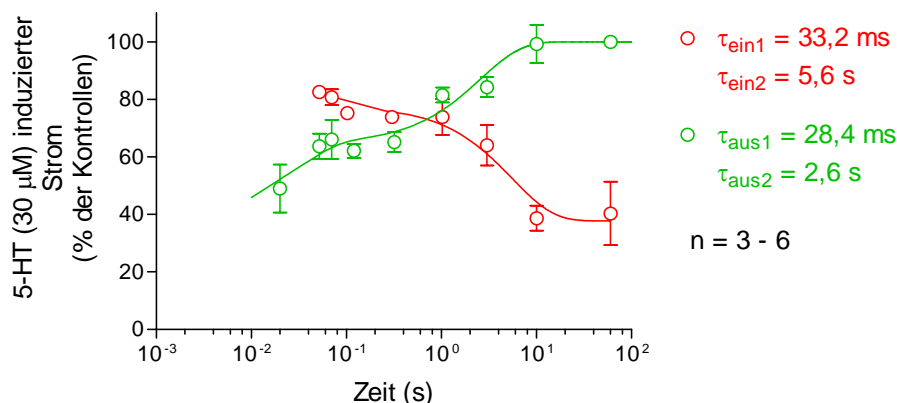
  

Auswasch:			
Best-fit values		95% Confidence Intervals	
YMAX1	29.78	YMAX1	21.67 to 37.90
K1	0.5784	K1	0.1846 to 0.9722
PLATEAU	49.87	PLATEAU	31.98 to 67.77
K2	23.25	K2	-12.93 to 59.42

Abbildung 31: a) +/- Einwasch und Auswasch von 14  $\mu$ M Propofol (Mittelwerte  $\pm$  SEM). Kontrolle (30  $\mu$ M 5-HT); Einwasch:  $\tau_{\text{ein1}} = 47,0 \text{ ms}$ ,  $\tau_{\text{ein2}} = 6 \text{ s}$ ; Auswasch:  $\tau_{\text{aus1}} = 42,9 \text{ ms}$ ,  $\tau_{\text{aus2}} = 1,7 \text{ s}$ ; b) Fitparameter für Ein- und Auswasch.

3.3.2.4 +/- Einwasch/Auswasch (29  $\mu$ M Propofol)

a)



b)

Einwasch:

Best-fit values		95% Confidence Intervals	
YMAX1	40.14	YMAX1	28.19 to 52.09
K1	0.1801	K1	0.02159 to 0.3386
PLATEAU	37.71	PLATEAU	27.39 to 48.04
K2	30.11	K2	-12.07 to 72.29

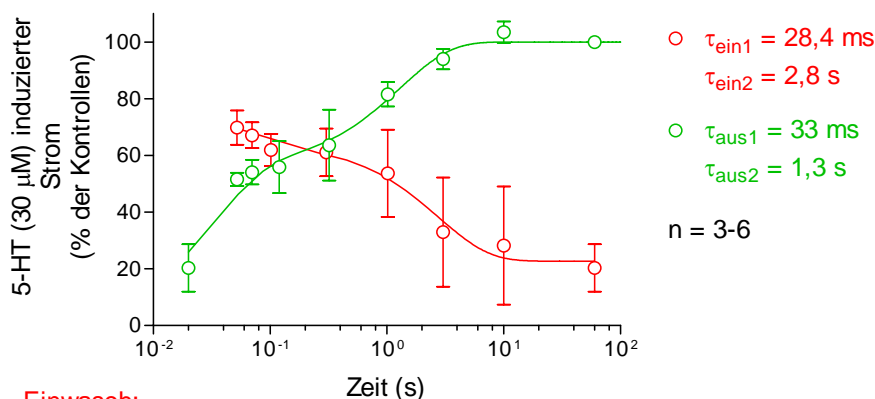
Auswasch:

Best-fit values		95% Confidence Intervals	
YMAX1	35.45	YMAX1	25.61 to 45.28
K1	0.3897	K1	0.02511 to 0.7542
PLATEAU (Constant)	37.81	K2	-3.824 to 74.15
K2	35.16		

Abbildung 32: a) +/- Einwasch und Auswasch von 29  $\mu$ M Propofol (Mittelwerte  $\pm$  SEM). Kontrolle (30  $\mu$ M 5-HT); Einwasch:  $\tau_{\text{ein1}} = 22 \text{ ms}$ ,  $\tau_{\text{ein2}} = 5,5 \text{ s}$ ; Auswasch:  $\tau_{\text{aus1}} = 28,4 \text{ ms}$ ,  $\tau_{\text{aus2}} = 2,6 \text{ s}$ ; b) Fitparameter für Ein- und Auswasch.

3.3.2.5 +/- Einwasch/Auswasch (51  $\mu$ M Propofol)

a)



b)

Einwasch:

Best-fit values		95% Confidence Intervals	
YMAX1	41.98	YMAX1	20.42 to 63.53
K1	0.3605	K1	-0.2826 to 1.004
PLATEAU	22.70	PLATEAU	7.544 to 37.85
K2	35.15	K2	-42.62 to 112.9

Auswasch:

Best-fit values		95% Confidence Intervals	
YMAX1	44.39	YMAX1	28.18 to 60.60
K1	0.7714	K1	0.01307 to 1.530
PLATEAU (Constant)	0.0	K2	5.748 to 54.74
K2	30.24		

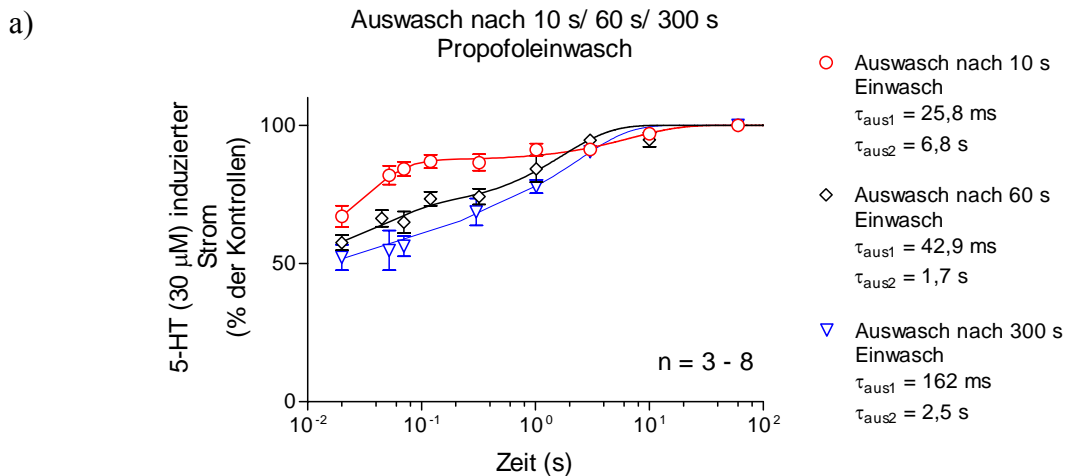
Abbildung 33: a) +/- Einwasch und Auswasch von 51  $\mu\text{M}$  Propofol (Mittelwerte  $\pm$  SEM). Kontrolle (30  $\mu\text{M}$  5-HT); Einwasch:  $\tau_{\text{ein1}} = 17,8 \text{ ms}$ ,  $\tau_{\text{ein2}} = 2,7 \text{ s}$ ; Auswasch:  $\tau_{\text{aus1}} = 33 \text{ ms}$ ,  $\tau_{\text{aus2}} = 1,3 \text{ s}$ ; b) Fitparameter für Ein- und Auswasch.

Alle Einwaschkinetiken ließen sich durch eine Funktion mit zwei Zeitkonstanten bestimmen, wovon eine im Millisekunden- und die andere im Sekundenbereich lag. Es ließ sich aber keine Konzentrationsabhängigkeit feststellen.

Die Auswaschkinetiken ließen sich ebenfalls mittels einer Funktion mit zwei Zeitkonstanten beschreiben, die auch im Millisekunden- und Sekundenbereich lagen, wobei auch hier eine Konzentrationsabhängigkeit nicht zu belegen war.

### 3.3.2.6 10s/ 60s/ 300s Einwasch/Auswasch (14 $\mu\text{M}$ Propofol)

Um die Möglichkeit zu überprüfen, ob der Auswasch von der Einwaschzeit des Propofols abhängig sein könnte, wurde Propofol für unterschiedliche Zeiten (10s/ 60 s/ 300 s) eingewaschen und es folgten die Auswaschexperimente mit den unterschiedlichen Auswaschzeiten (Abb. 34).



b)

#### 10 s Einwasch

Best-fit values		95% Confidence Intervals	
YMAX1	12.66	YMAX1	9.048 to 16.26
K1	0.1465	K1	-0.002588 to 0.2957
PLATEAU	43.36	PLATEAU	15.55 to 71.17
K2	38.75	K2	10.20 to 67.30

#### 60 s Einwasch:

Best-fit values		95% Confidence Intervals	
YMAX1	29.80	YMAX1	21.77 to 37.84
K1	0.5797	K1	0.1901 to 0.9692
PLATEAU	49.86	PLATEAU	32.18 to 67.53
K2	23.31	K2	-12.41 to 59.02

#### 300 s Einwasch

Best-fit values		95% Confidence Intervals	
YMAX1	32.88	YMAX1	4.690 to 61.07
K1	0.4021	K1	-0.1601 to 0.9643
PLATEAU	49.36	PLATEAU	35.60 to 63.12
K2	6.185	K2	-14.84 to 27.21

Abbildung 34: a) 10 s/60 s/300 s Einwasch und Auswasch von 14  $\mu\text{M}$  Propofol (Mittelwerte  $\pm$  SEM). Kontrolle (30  $\mu\text{M}$  5-HT); Auswasch: nach 10 s Einwasch:  $\tau_{\text{aus1}} = 25,8 \text{ ms}$ ,  $\tau_{\text{aus2}} = 6,8 \text{ s}$ ; nach 60 s Einwasch:  $\tau_{\text{aus1}} = 42,9 \text{ ms}$ ,  $\tau_{\text{aus2}} = 1,7 \text{ s}$ ; nach 300 s Einwasch:  $\tau_{\text{aus1}} = 103 \text{ ms}$ ,  $\tau_{\text{aus2}} = 2,3 \text{ s}$ ; b) Fitparameter für den Auswasch nach 10 s, 60 s, und 300 s Propofoleinwasch.

Alle Auswaschkinetiken waren durch eine Zeitkonstante im Millisekundenbereich sowie eine im Sekundenbereich charakterisiert. Es ließ sich jedoch keine Konzentrationsabhängigkeit der langsamen Zeitkonstanten feststellen. Der Prozess, der durch die schnelle Zeitkonstante charakterisiert war, scheint jedoch nach einem Propofoleinwasch von 10 s auch am schnellsten wieder ausgewaschen und somit konzentrationsabhängig zu sein.

Bei allen Einwaschexperimenten konnte eine Beschleunigung der Desensibilisierungszeitkonstanten durch Propofol beobachtet werden.

### 3.3.3 Konzentrationssprungexperimente

Da bei allen Einwaschexperimenten aufgrund der technischen Gegebenheiten die kürzeste Einwaschzeit 32 ms betrug (siehe Methoden 2.2.2.3), nach dieser Zeit jedoch schon bis zu 25 % der Maximalinhibierung erreicht waren, wurden Konzentrationssprungexperimente durchgeführt. Diese sollten dazu beitragen, den Prozess, der in den ersten 32 ms nach Propofolapplikation einsetzt, zu differenzieren.

50 ms nachdem ein Strom mit 30  $\mu$ M 5-HT induziert wurde, wurde eine bestimmte Propofolkonzentration mit 30  $\mu$ M 5-HT appliziert.

#### 3.3.3.1 Propofol (5 $\mu$ M)

Bei 5  $\mu$ M Propofol konnte schon eine Beschleunigung der Desensibilisierung im Vergleich zur Kontrollstromspur festgestellt werden (Abb. 35). Diese Konzentrationsprünge wurden monoexponentiell bestimmt (Abb. 36)

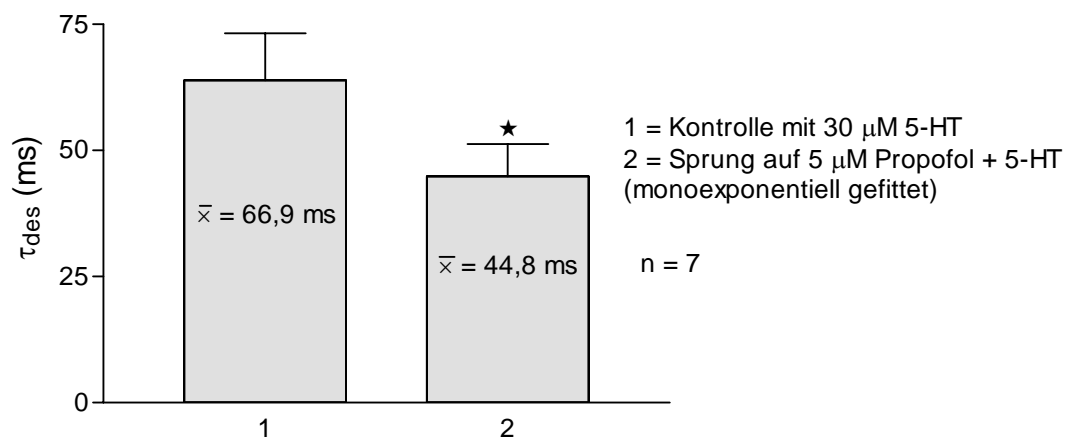


Abbildung 35: Desensibilisierungszeitkonstanten während der Konzentrationssprünge (Mittelwerte + SEM); 1 = 30  $\mu$ M 5-HT (66,9 ms), 2 = 5  $\mu$ M Propofol + 30  $\mu$ M 5-HT (44,8 ms),  $n = 7$ ; \* =  $p \leq 0,05$ , gepaarter t-test, basierend auf den Absolutwerten.

Beispielstromspuren:

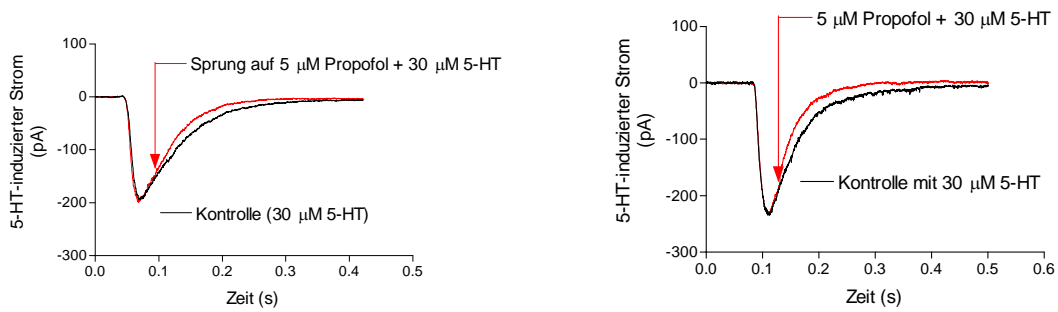


Abbildung 36: Beispielstromspuren für Konzentrationssprünge auf 5  $\mu\text{M}$  Propofol. Kontrolle: 30  $\mu\text{M}$  5-HT.

### 3.3.3.2 Propofol (14 $\mu\text{M}$ )

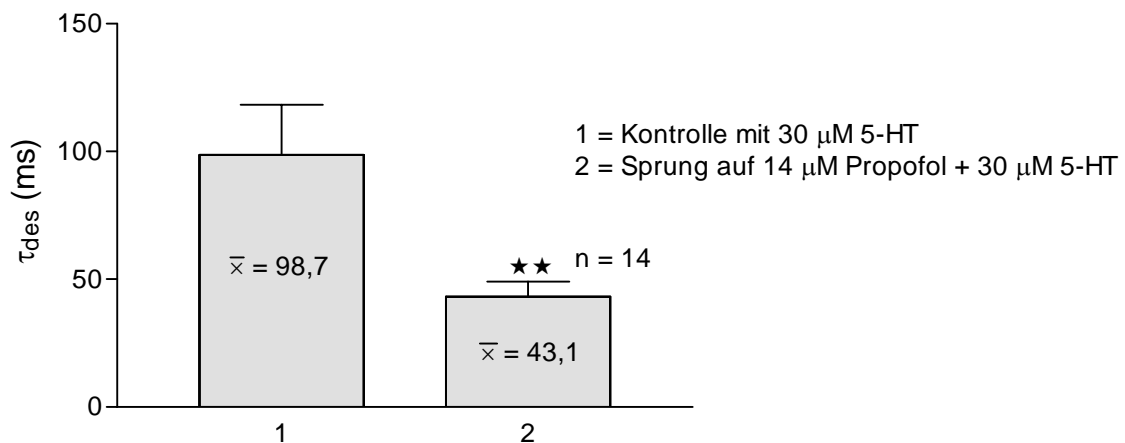


Abbildung 37: Desensibilisierungszeitkonstanten während der Konzentrationssprünge (Mittelwerte + SEM); 1 = 30  $\mu\text{M}$  5-HT (98,7 ms), 2 = 14  $\mu\text{M}$  Propofol + 30  $\mu\text{M}$  5-HT (43,1 ms),  $n = 14$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ , gepaarter t-test, basierend auf den Absolutwerten.

Beispielstromspuren:

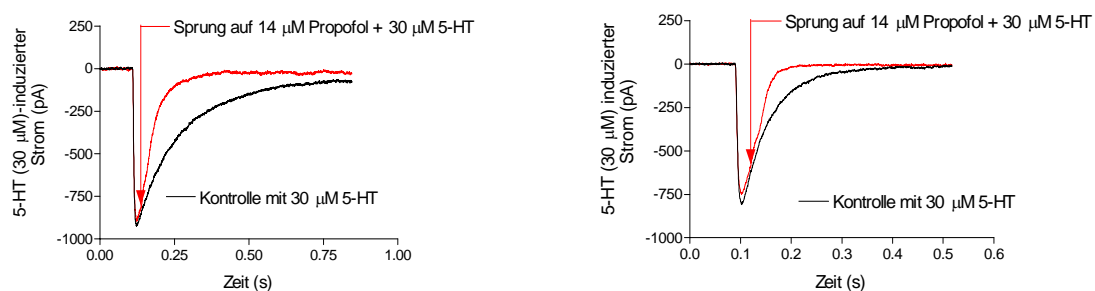


Abbildung 38: Beispielstromspuren für Konzentrationssprünge auf 14  $\mu\text{M}$  Propofol. Kontrolle: 30  $\mu\text{M}$  5-HT.

### 3.3.3.3 Propofol (29 $\mu$ M)

Ein monoexponentieller Fit reichte auch bei dieser Konzentration aus, da die Kanäle sich zu schnell schließen, um eine zweite sinnvolle Zeitkonstante bestimmen zu können.

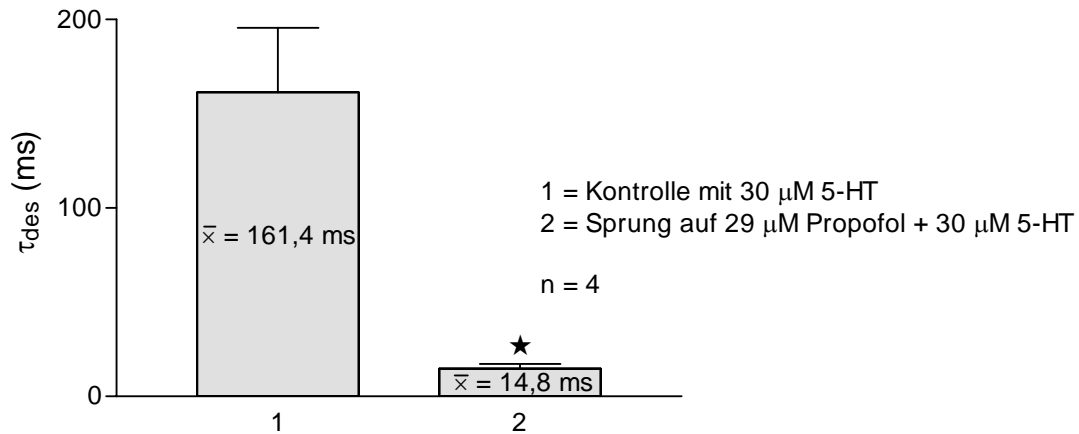


Abbildung 39: Desensibilisierungszeitkonstanten während der Konzentrationssprünge (Mittelwerte + SEM); 1 = 30  $\mu$ M 5-HT (161,4 ms), 2 = 29  $\mu$ M Propofol + 30  $\mu$ M 5-HT (14,8 ms),  $n = 4$ ; \* =  $p \leq 0,05$ , gepaarter t-test, basierend auf den Absolutwerten.

Beispielstromspuren:

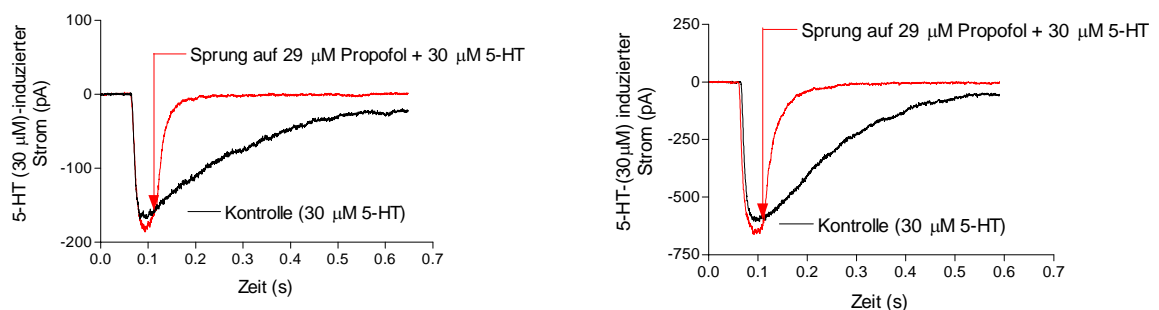


Abbildung 40: Beispielstromspuren für Konzentrationssprünge auf 29  $\mu$ M Propofol. Kontrolle: 30  $\mu$ M 5-HT.



### 3.3.3.4 Propofol (51 $\mu$ M)

Die Desensibilisierungszeitkonstante wurde bei dieser hohen Propofolkonzentration nochmals beschleunigt (Abb. 41).

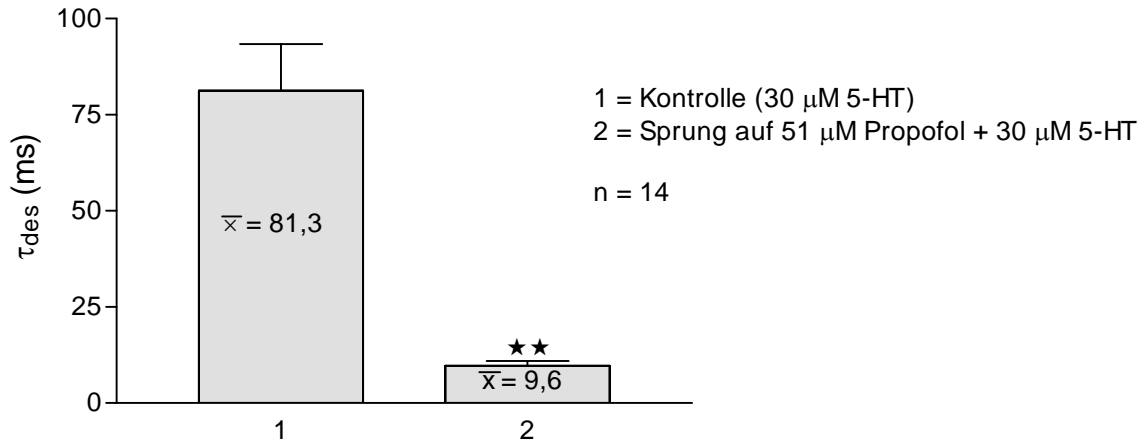


Abbildung 41: Desensibilisierungszeitkonstanten während der Konzentrationssprünge (Mittelwerte + SEM); 1 = 30  $\mu$ M 5-HT (81,3 ms), 2 = 5  $\mu$ M Propofol + 30  $\mu$ M 5-HT (9,6 ms), n = 14; \*\* =  $p \leq 0,05$ , gepaarter t-test, basierend auf den Absolutwerten.

Beispielstromspuren:

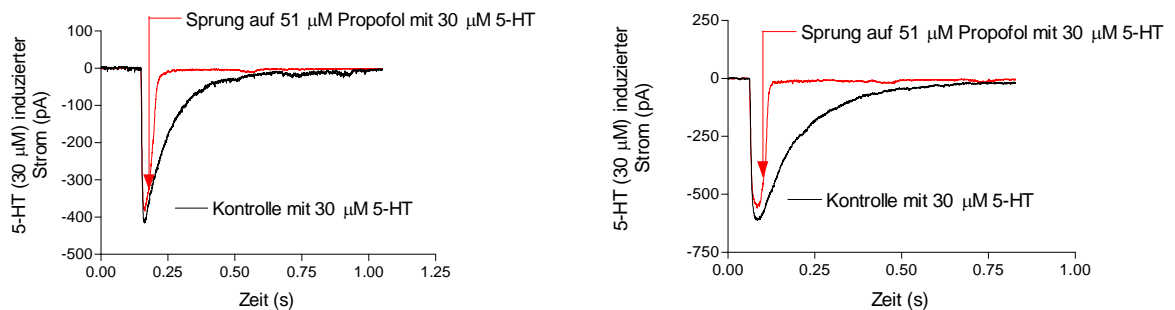


Abbildung 42: Beispielstromspuren für Konzentrationssprünge auf 51  $\mu$ M Propofol. Kontrolle: 30  $\mu$ M 5-HT.

### 3.3.3.5 Propofol (172 $\mu\text{M}$ )

Auch bei dieser Konzentration kam es durch die Propofolapplikation zum sofortigen Schließen der Kanäle (Abb. 43).

Die Zeitkonstante von 8,5 ms, mit der dieser Prozess ablief, ist ca. 1 ms schneller als bei 51  $\mu\text{M}$  Propofol. Dies könnte bedeuten, dass der Prozess, der durch Propofol in Gang gesetzt wurde, bei diesen Konzentrationen bereits mit der Maximalgeschwindigkeit, mit der er ablaufen kann, ablief und nicht mehr beschleunigt werden konnte.

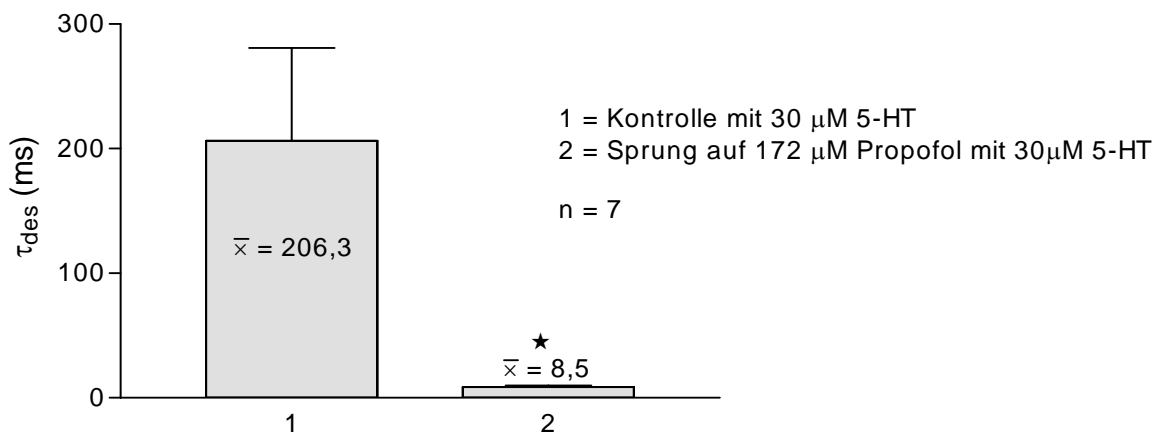


Abbildung 43: Desensibilisierungszeitkonstanten während der Konzentrationssprünge (Mittelwerte + SEM); 1 = 30  $\mu\text{M}$  5-HT (206,3 ms), 2 = 172  $\mu\text{M}$  Propofol + 30  $\mu\text{M}$  5-HT (8,5 ms), n = 7; \* =  $p \leq 0,05$ , gepaarter t-test, basierend auf den Absolutwerten.

Beispielstromspuren:

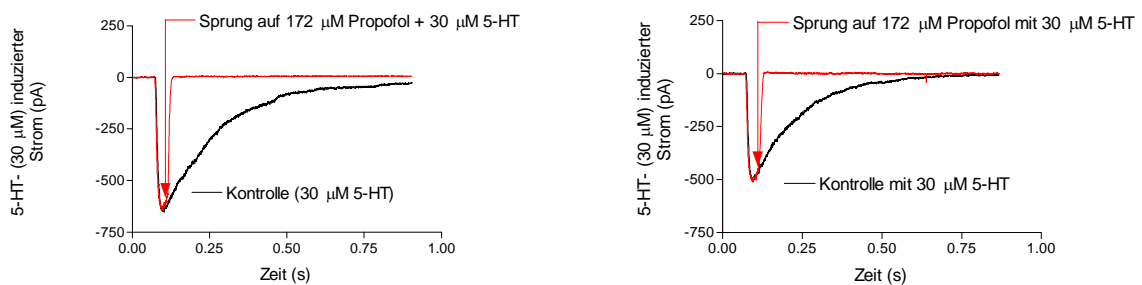


Abbildung 44: Beispielstromspuren für Konzentrationssprünge auf 172  $\mu\text{M}$  Propofol. Kontrolle: 30  $\mu\text{M}$  5-HT.

### 3.3.3.6 Vergleich der Zeitkonstanten der Konzentrationssprünge

Ein Vergleich der Zeitkonstanten (Abb. 45) der Konzentrationssprünge macht deutlich, dass es zunächst zu einer konzentrationsabhängigen Beschleunigung der Zeitkonstanten kam. Ab 51  $\mu\text{M}$  Propofol wurde jedoch ein Plateau erreicht, ab dem der Prozess des Schließens der Kanäle wenig beschleunigt werden konnte.

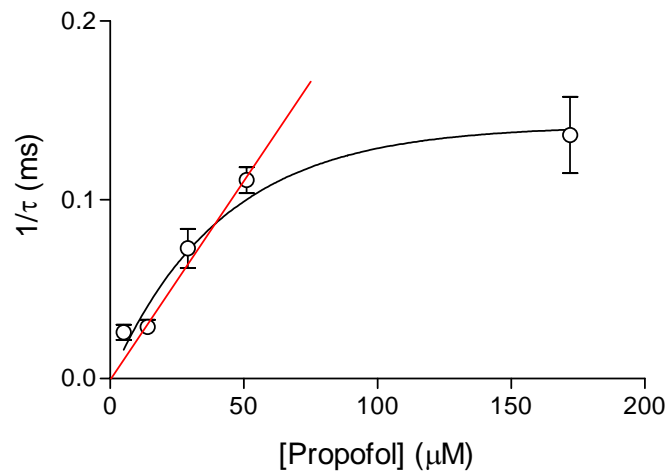


Abbildung 45: Abhängigkeit der Zeitkonstanten der Konzentrationssprünge von der Propofolkonzentration (Mittelwerte  $\pm$  SEM).

### 3.3.4 Kompetitivitätstest

Dieser Test sollte weiter Aufschluss über den Wirkort von Propofol geben, bzw. ob Propofol ein kompetitiver Antagonist ist und Serotonin von der Bindungsstelle am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor verdrängt.

Wenn Propofol ein kompetitiver Antagonist wäre, müsste eine Erhöhung der Serotoninkonzentration dazu führen, dass die Hemmung des 5-HT induzierten Stroms durch Propofol verringert würde.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden diese Experimente bei einer Propofolkonzentration von 14  $\mu$ M durchgeführt. Diese Konzentration führte bei 30  $\mu$ M 5-HT im -+ Applikationsmodus zu einer Inhibierung von 30 %. Als Testkonzentrationen wurden 3  $\mu$ M (Abb. 46), 30  $\mu$ M (Abb. 47) und 300  $\mu$ M (Abb. 48) Serotonin eingesetzt. Als Kontrolle diente auch hier der durch 30  $\mu$ M 5-HT induzierte Strom.

#### a) 3 $\mu$ M 5-HT

Beispielstromspuren:

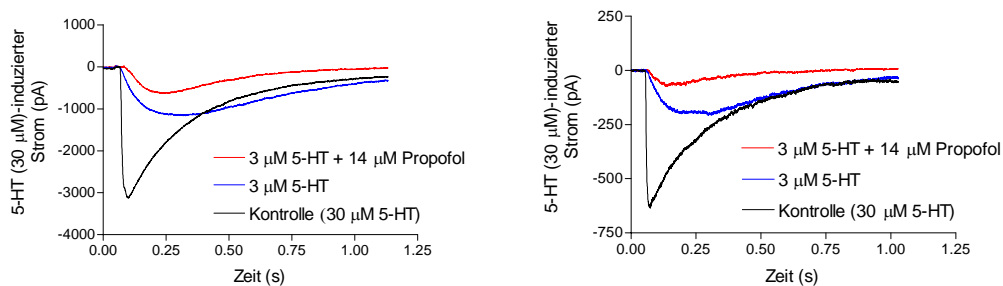


Abbildung 46: Beispielstromspuren zum Kompetitivitätstest. Schwarz: Kontrolle (30  $\mu$ M 5-HT); blau: 3  $\mu$ M 5-HT; rot: 14  $\mu$ M Propofol + 3  $\mu$ M 5-HT.

#### b) 30 $\mu$ M 5-HT

Beispielstromspuren:

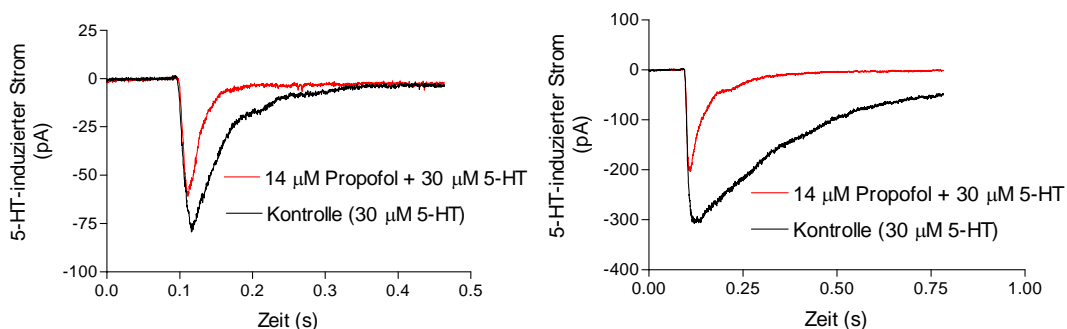


Abbildung 47 : Beispielstromspuren zum Kompetitivitätstest. Schwarz: Kontrolle (30  $\mu$ M 5-HT); rot: 14  $\mu$ M Propofol + 30  $\mu$ M 5-HT.

c) 300  $\mu\text{M}$  5-HT

Beispielstromspuren:

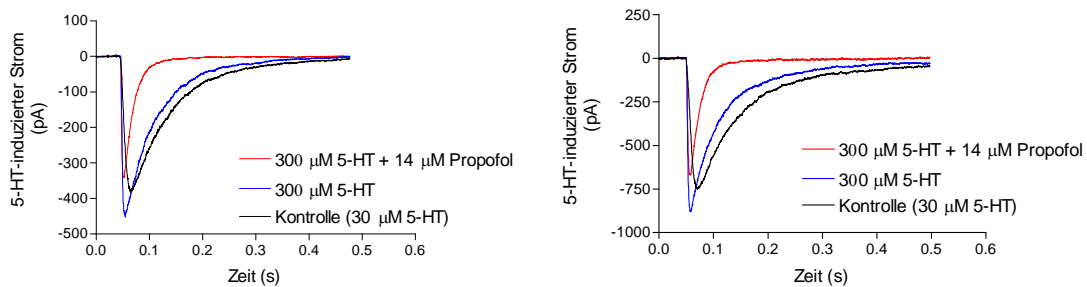


Abbildung 48: Beispielstromspuren zum Kompetitivitätstest. Schwarz: Kontrolle (30  $\mu\text{M}$  5-HT); blau: 300  $\mu\text{M}$  5-HT; rot: 14  $\mu\text{M}$  + 300  $\mu\text{M}$  5-HT.

Bei der eingesetzten Konzentration von 3  $\mu\text{M}$  Serotonin kam es zu einer Inhibierung des Stroms durch 14  $\mu\text{M}$  Propofol um 62,8 %. Der durch 30  $\mu\text{M}$  Serotonin induzierte Strom wurde um 30 % und der durch 300  $\mu\text{M}$  Serotonin induzierte Strom um 18,2 % gehemmt (Abb. 49). Die durch Propofol induzierte Inhibierung ließ sich folglich durch Serotonin antagonisieren. Weiterhin konnte auch in diesen Experimenten die Beschleunigung der Desensibilisierungszeitkonstanten beobachtet werden.

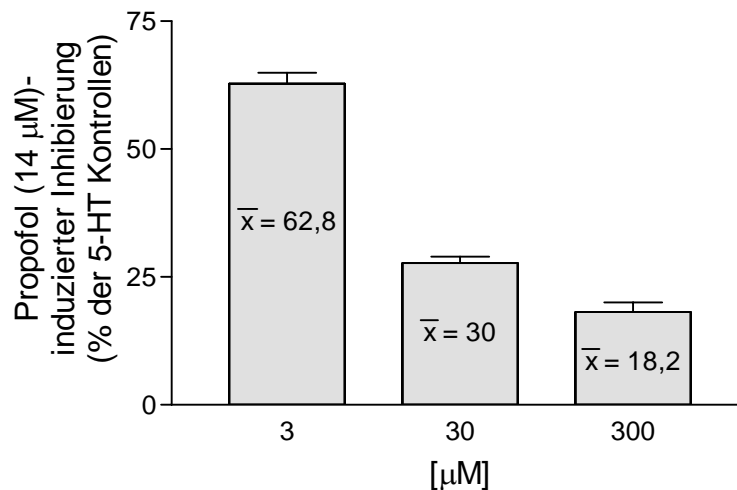
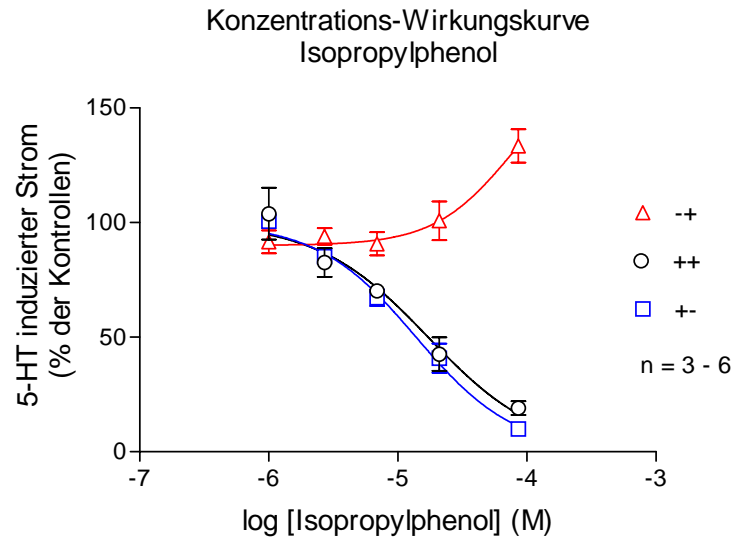


Abbildung 49: Kompetitivitätstest mit 3  $\mu\text{M}$  5-HT + 14  $\mu\text{M}$  Propofol, 30  $\mu\text{M}$  5-HT + 14  $\mu\text{M}$  Propofol, 300  $\mu\text{M}$  5-HT + 14  $\mu\text{M}$  Propofol.

### 3.3.5 Isopropylphenol: Konzentrations-Wirkungskurven

Die Konzentrations-Wirkungskurven von Isopropylphenol wurden für alle drei Applikationsarten erstellt. Die Kurven konnten am besten durch monophasische Funktionen beschrieben werden (Abb. 50).

a)



b)

Fitparameter für die einzelnen Applikationsmodi:

++		+-		-+	
Best-fit values		Best-fit values		Best-fit values	
BOTTOM (Constant)	0.0	BOTTOM (Constant)	0.0	BOTTOM (Constant)	90.00
TOP (Constant)	100.0	TOP (Constant)	100.0	TOP (Constant)	170.0
LOGEC50	-4.765	LOGEC50	-4.858	LOGEC50	-4.116
HILLSLOPE	-1.011	HILLSLOPE	-1.135	HILLSLOPE	1.446
EC50	1.7170e-005	EC50	1.3860e-005	EC50	7.6480e-005

c) Beispielstromspuren:

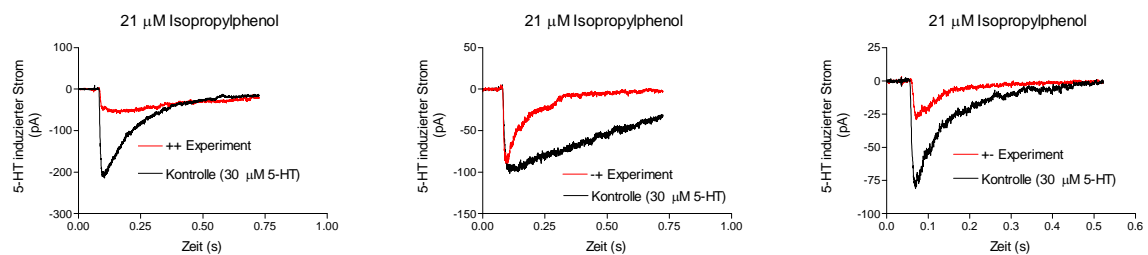


Abbildung 50: a) Konzentrations-Wirkungskurven von Isopropylphenol (Mittelwerte  $\pm$  SEM), schwarz = ++ Applikation,  $IC_{50}$  = 17,1  $\mu$ M; blau = +- Applikation,  $IC_{50}$  = 13,9  $\mu$ M; rot = -+ Applikation,  $EC_{50}$  = 76,5  $\mu$ M; b) Fitparameter; c) Beispielstromspuren.

Isopropylphenol wirkte nicht nur hemmend, sondern auch potenzierend am 5-HT<sub>3A</sub> Rezeptor. Im ++ und +- Applikationsmodus kam es zu einem inhibierenden Effekt ( $IC_{50}$  ++ = 17,1  $\mu$ M,  $IC_{50}$  +- = 13,9  $\mu$ M), im -+ Modus wurde die Wirkung des 5-HTs potenziert ( $EC_{50}$  -+ = 76,5  $\mu$ M).

Der Einfluss auf die Aktivierungs- und Desensibilisierungszeitkonstanten ist in Abb. 51 dargestellt. Die Aktivierungszeitkonstanten wurden im ++ und -+ Modus stark verlangsamt, im +- Modus blieben sie unbeeinflusst. Auch auf die Desensibilisierungszeitkonstanten hatten der ++ und -+ Modus einen großen verlangsamen Effekt, im +- Modus blieben sie wiederum unbeeinflusst.

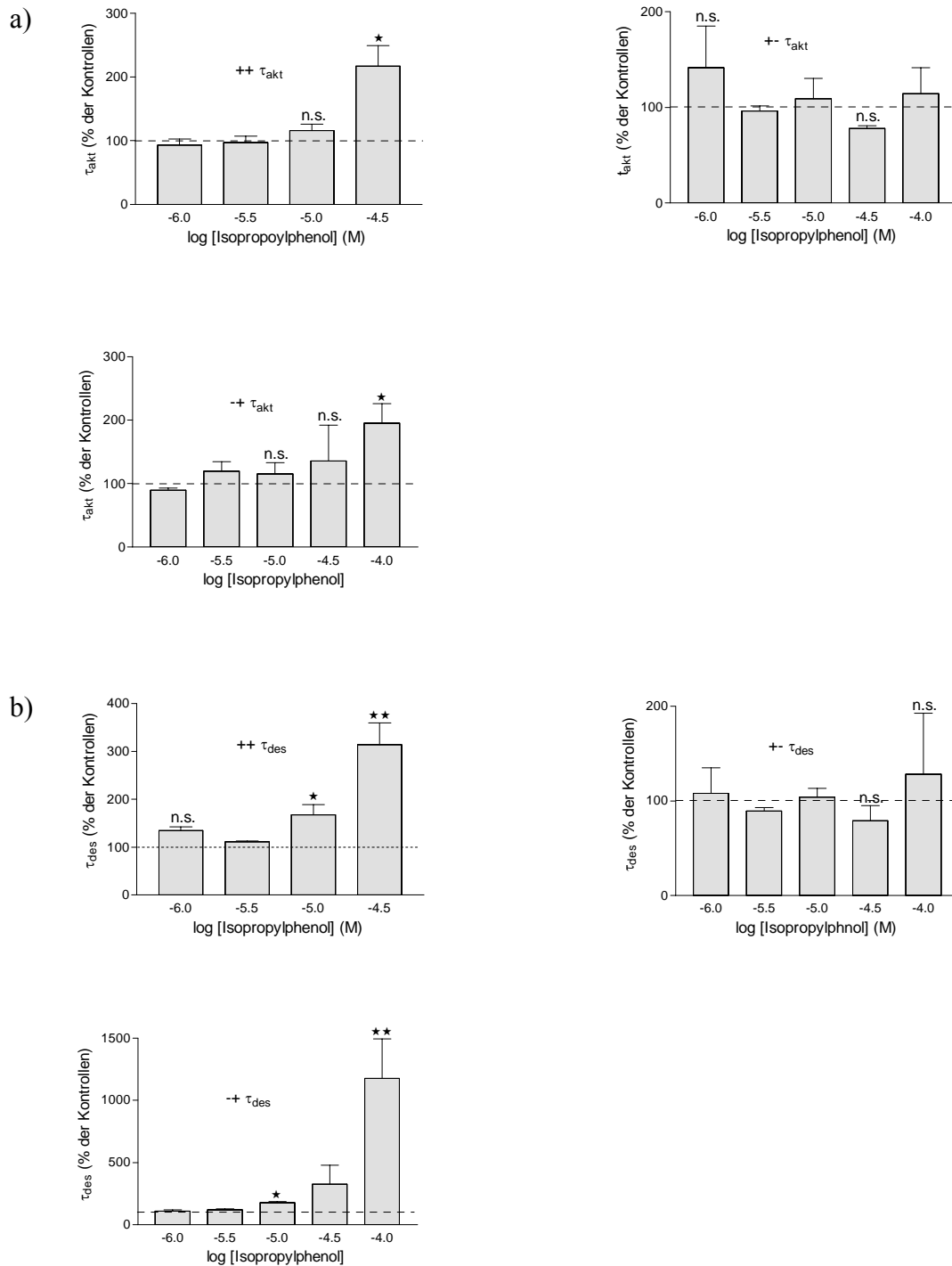
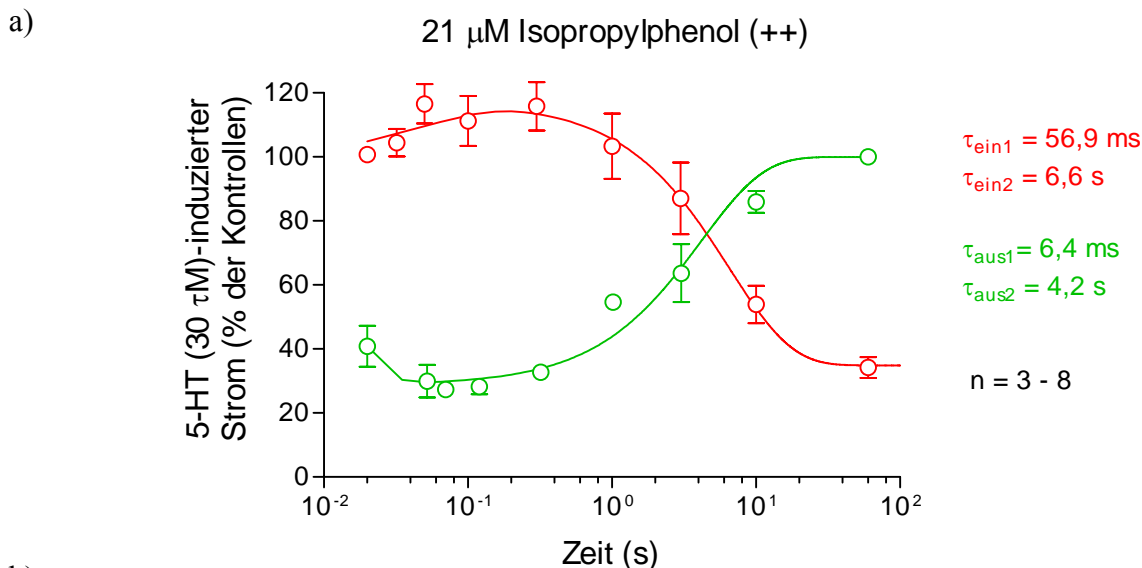


Abbildung 51: Konzentrationsabhängigkeit der a) Aktivierungs- ( $\tau_{akt}$ ) und b) Desensibilisierungszeitkonstanten ( $\tau_{des}$ ) der verschiedenen Applikationsmodi (Mittelwerte + SEM), \* =  $p \leq 0,05$ , gepaarter t-test, basierend auf Absolutwerten, \*\* =  $p \leq 0,01$ , gepaarter t-test.

### 3.3.6 Isopropylphenol: Einwasch und Auswasch

Um einen ersten Eindruck über die Kinetik der Isopropylphenoleffekte zu bekommen, wurden bei dem  $IC_{50}$ -Wert die Ein- und Auswaschzeitkonstanten im ++ Applikationsmodus gemessen.



b) **Einwasch:**

Best-fit values		95% Confidence Intervals	
YMAX1	82.37	YMAX1	65.06 to 99.69
K1	0.1526	K1	0.05482 to 0.2503
PLATEAU	34.86	PLATEAU	23.51 to 46.22
K2	17.57	K2	-18.10 to 53.24

**Auswasch:**

Best-fit values		95% Confidence Intervals	
YMAX1	71.34	YMAX1	66.51 to 76.17
K1	0.2392	K1	0.1635 to 0.3149
PLATEAU	296.4	PLATEAU	-20050 to 20640
K2	155.8	K2	-3753 to 4065

Abbildung 52: a) Einwasch (rot) und Auswasch (grün) von 21  $\mu$ M Isopropylphenol im ++ Modus (Mittelwerte  $\pm$  SEM). Kontrollen: 30  $\mu$ M 5-HT. Die ersten 32 ms waren nicht auflösbar, danach waren die Effekte von der Vorapplikationszeit abhängig. Die Effekte konnten durch zwei Zeitkonstanten charakterisiert werden; b) Fitparameter

Sowohl der Einwasch, als auch der Auswasch waren durch zwei Zeitkonstanten charakterisiert (Abb. 52), wovon je eine im Millisekunden- ( $\tau_1$ ), die andere im Sekundenbereich ( $\tau_2$ ) lagen. Beide Prozesse waren von der Vorapplikationszeit abhängig. Im Einwasch kam es bei kurzen Applikationszeiten zu einer leichten Potenzierung der Peakströme, die dann aber in eine Inhibierung der Ströme überging. Bei kurzen Auswaschzeiten blieb die Inhibierung noch bestehen, erst nach ca. 300 ms begann sich die Inhibierung zu verringern.



### 3.3.7 Isopropylphenol: Konzentrationssprungexperimente

Da bei den Einwaschexperimenten aufgrund der technischen Gegebenheiten die kürzeste Einwaschzeit 32 ms betrug, wurden Konzentrationssprungexperimente durchgeführt. Diese sollten dazu beitragen, den Prozess, der in den ersten 32 ms nach Isopropylphenolapplikation einsetzt, zu differenzieren.

#### 3.3.7.1 Isopropylphenol (21 $\mu$ M) mit/ohne 30 $\mu$ M 5-HT

50 ms nachdem ein Strom mit 30  $\mu$ M 5-HT induziert wurde, wurde die  $IC_{50}$  Isopropylphenolkonzentration mit 30  $\mu$ M 5-HT, bzw. ohne 5-HT appliziert. Alleine führte Isopropylphenol nicht zur Aktivierung der 5-HT<sub>3A</sub> Kanäle. Bei einer Koapplikation mit Serotonin kam es zu einer Potenzierung der Ströme. Deshalb sollte in diesen Konzentrationssprungexperimenten überprüft werden, in wie weit die Anwesenheit von Serotonin beim Sprung eine Rolle spielt. Verglichen wurden wie bei den Konzentrationssprüngen mit Propofol die Desensibilisierungszeitkonstanten nach dem Konzentrationssprung, allerdings wurden sie hier (Abb. 53) in % der 30  $\mu$ M 5-HT Kontrollen angegeben, um zu verdeutlichen, wie stark verlangsamt diese Zeitkonstanten im Vergleich zur Kontrolle waren.

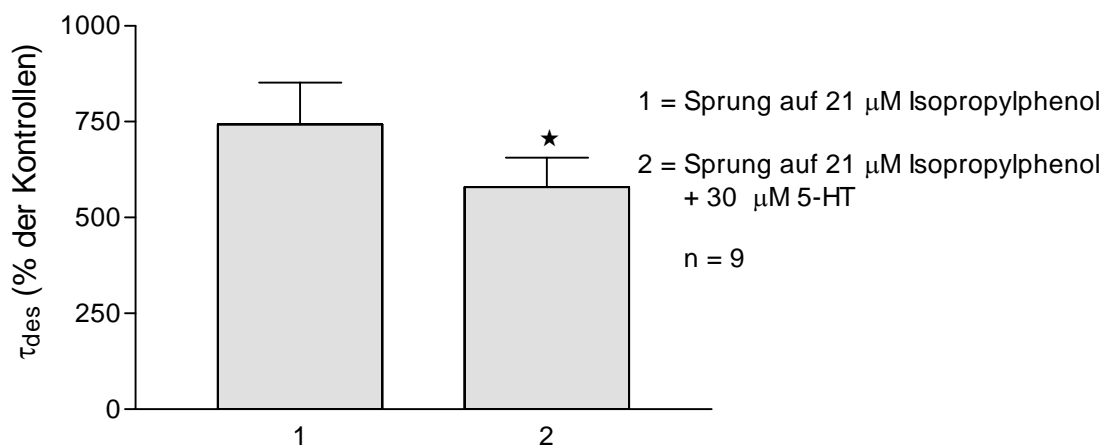


Abbildung 53: Desensibilisierungszeitkonstanten (Mittelwerte + SEM) während der Konzentrationssprünge; 1 = Sprung auf 21  $\mu$ M Isopropylphenol, 2 = 21  $\mu$ M Isopropylphenol + 30  $\mu$ M 5-HT, n = 9; \* =  $p \leq 0,05$ , gepaarter t-test, basierend auf den Absolutwerten.

Beim Konzentrationssprung auf 21  $\mu$ M Isopropylphenol ohne 5-HT werden zunächst nochmals Kanäle geöffnet. Diese desensibilisieren sehr viel langsamer als „normale“ 5-HT induzierte Ströme.

Ist beim Sprung zusätzlich noch 30  $\mu\text{M}$  5-HT enthalten, werden noch mehr Kanäle geöffnet. Die so induzierten Ströme desensibilisieren schneller als die, die mit 21  $\mu\text{M}$  Isopropylphenol induziert wurden, aber deutlich langsamer als die 30  $\mu\text{M}$  5-HT Kontrollen (Abb.54).

Beispielstromspuren:

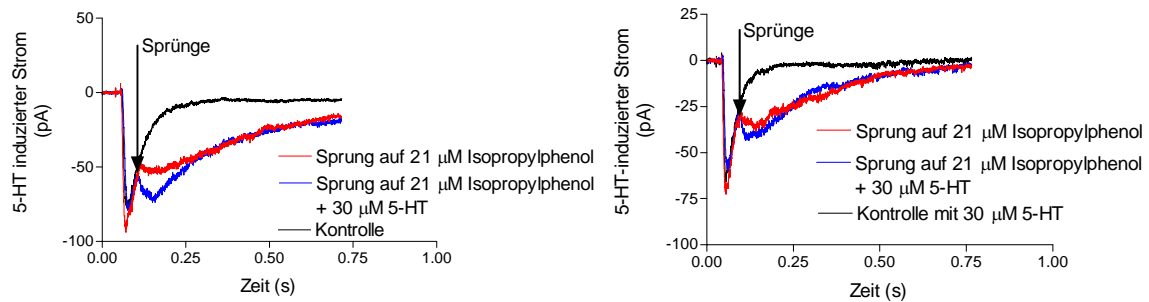


Abbildung 54: Konzentrationssprungexperimente auf 21  $\mu\text{M}$  Isopropylphenol. Schwarz: Kontrolle (30  $\mu\text{M}$  5-HT); blau: 21  $\mu\text{M}$  Isopropylphenol + 30  $\mu\text{M}$  5-HT; rot: 21  $\mu\text{M}$  Isopropylphenol.

### 3.3.7.2 Isopropylphenol (21 $\mu\text{M}$ ) mit 30 $\mu\text{M}$ / 300 $\mu\text{M}$ 5-HT

21  $\mu\text{M}$  Isopropylphenol führten schon ohne 5-HT bei der Applikation auf geöffnete Kanäle zum erneuten Öffnen der Kanäle. Verstärkt wurde dieser Effekt durch die gleichzeitige Gabe von 5-HT. Nun sollte überprüft werden, ob eine weitere Erhöhung der 5-HT Konzentration dazu führt, dass mehr Kanäle geöffnet werden. Aus diesem Grund wurden die Konzentrationssprungexperimente mit einem Sprung auf 21  $\mu\text{M}$  Isopropylphenol + 30  $\mu\text{M}$  5-HT, bzw. mit einem Sprung auf 21  $\mu\text{M}$  Isopropylphenol + 300  $\mu\text{M}$  5-HT wiederholt (Abb. 55).

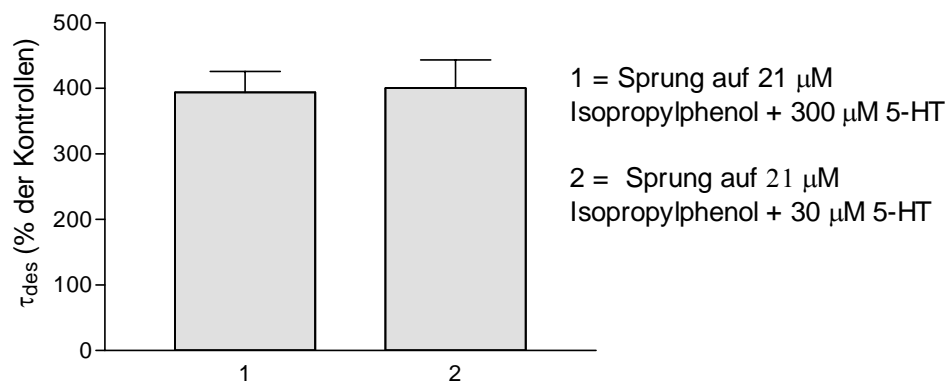


Abbildung 55: Desensibilisierungszeitkonstanten (Mittelwerte + SEM) während der Konzentrationssprünge; 1 = Sprung mit 21  $\mu\text{M}$  Isopropylphenol + 300  $\mu\text{M}$  5-HT, 2 = 21  $\mu\text{M}$  Isopropylphenol + 30  $\mu\text{M}$  5-HT,  $n = 9$

Die Erhöhung der Serotoninkonzentration von 30  $\mu\text{M}$  auf 300  $\mu\text{M}$  zeigte keinen weiteren Effekt; weder einen verstärkenden noch einen abgeschwächten (Abb. 56).

Beispielstromspuren:

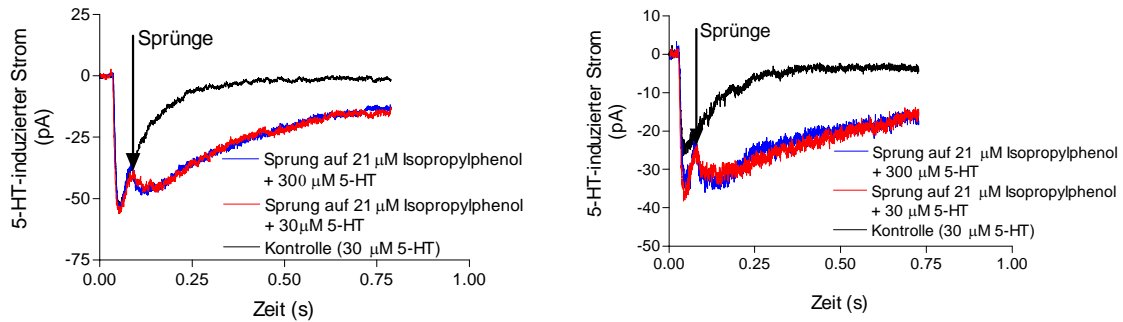


Abbildung 56: Konzentrationssprungexperimente auf 21  $\mu\text{M}$  Isopropylphenol. Schwarz: Kontrolle (30  $\mu\text{M}$  5-HT); blau: 21  $\mu\text{M}$  Isopropylphenol + 300  $\mu\text{M}$  5-HT; rot: 21  $\mu\text{M}$  Isopropylphenol + 30  $\mu\text{M}$  5-HT.

### 3.3.8 Isopropylphenol: Kompetitivitätstest

Um zu überprüfen, ob auch bei Isopropylphenol ein kompetitiver Wirkmechanismus vorliegen könnte, wurde dieser Kompetitivitätstest bei einer Isopropylphenolkonzentration von 21  $\mu\text{M}$  durchgeführt. Als Testkonzentrationen wurden 1  $\mu\text{M}$  (Abb. 57) und 3  $\mu\text{M}$  (Abb. 58) Serotonin eingesetzt. Als Kontrolle diente auch hier der durch 30  $\mu\text{M}$  5-HT induzierte Strom.

a) 1  $\mu\text{M}$  5-HT alleine konnte nur einen geringen Strom induzieren. Die gemeinsame Applikation mit 21  $\mu\text{M}$  Isopropylphenol jedoch führte zu einem deutlichen Öffnen der Kanäle.

Beispielstromspuren:

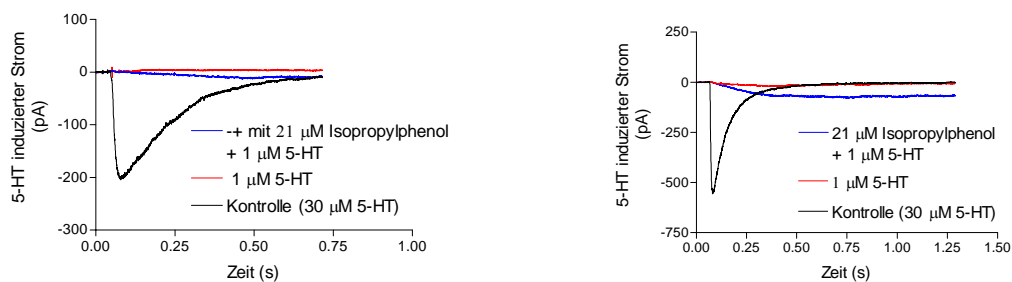


Abbildung 57: Kompetitivitätstest mit 21  $\mu\text{M}$  Isopropylphenol. Schwarz: 30  $\mu\text{M}$  5-HT, rot: 1  $\mu\text{M}$  5-HT, blau: 21  $\mu\text{M}$  Isopropylphenol + 1  $\mu\text{M}$  5-HT; 1  $\mu\text{M}$  5-HT + 21  $\mu\text{M}$  Isopropylphenol lösten einen makroskopischen Strom aus.

b) 3  $\mu\text{M}$  5-HT löste schon alleine einen Strom aus (Abb. 58), welcher durch die Koapplikation von 21  $\mu\text{M}$  Isopropylphenol noch verstärkt wurde.

Beispielstromspuren:

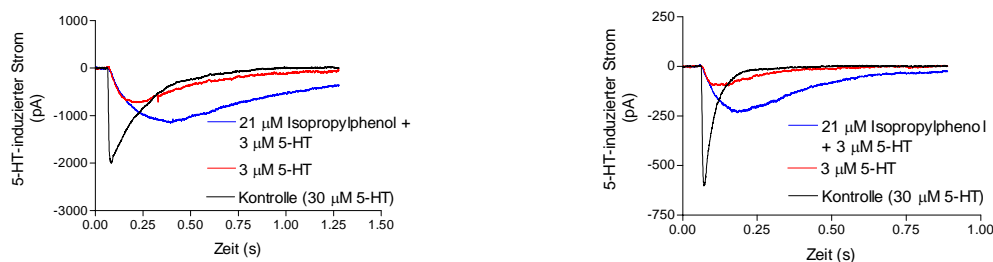


Abbildung 58: Kompetitivitätstest mit 21  $\mu\text{M}$  Isopropylphenol. Schwarz: 30  $\mu\text{M}$  5-HT, rot: 3  $\mu\text{M}$  5-HT, blau: 21  $\mu\text{M}$  Isopropylphenol + 3  $\mu\text{M}$  5-HT.

c) der durch 30  $\mu\text{M}$  5-HT induzierte Strom wurde im Mittel nur noch um 10 % potenziert.

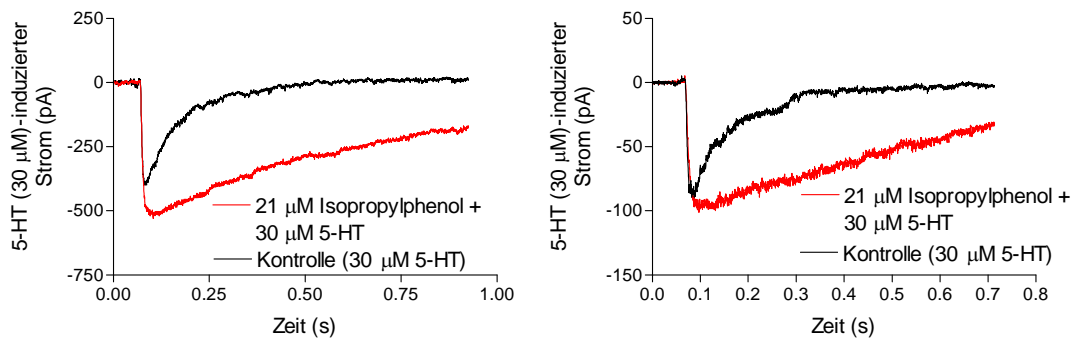


Abbildung 59: Kompetitivitätstest mit 21  $\mu\text{M}$  Isopropylphenol. Schwarz: 30  $\mu\text{M}$  5-HT, rot: 3  $\mu\text{M}$  5-HT, blau: 21  $\mu\text{M}$  Isopropylphenol + 3  $\mu\text{M}$  5-HT.

Bei der Applikation von 1  $\mu\text{M}$  5-HT kam es zur Induktion eines Stromes, der durch 21  $\mu\text{M}$  Isopropylphenol um 240 % potenziert werden konnte. Bei 21  $\mu\text{M}$  Isopropylphenol mit 3  $\mu\text{M}$  5-HT kam es zu einer Potenzierung des durch 3  $\mu\text{M}$  5-HT ausgelösten Stromes um 177 % und bei 21  $\mu\text{M}$  Isopropylphenol mit 30  $\mu\text{M}$  5-HT zeigte sich im +- Applikationsmodus ein minimaler Potenzierungseffekt um 10% (Abb. 59). So wie beim Propofol der Hemmeffekt bei zunehmenden 5-HT Konzentrationen verringert wurde, kam es auch beim Isopropylphenol durch eine Konzentrationserhöhung des Serotonins zu einer Reduktion des potenzierenden Effektes. Es scheint sich folglich im Falle des Isopropylphenols ebenfalls um einen kompetitiven Antagonisten zu handeln.

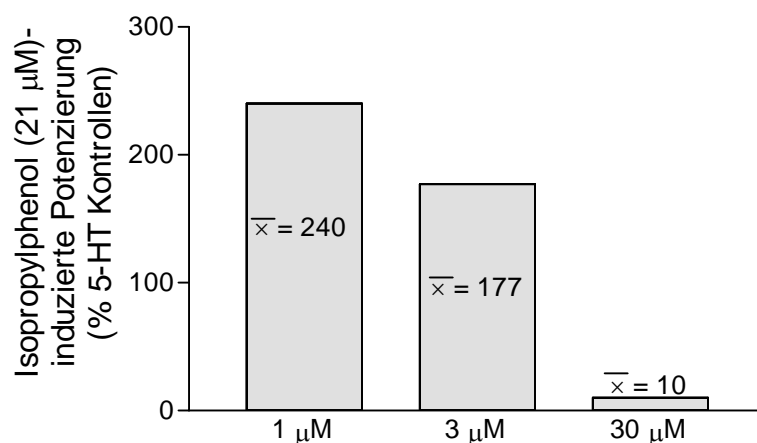


Abbildung 60: Kompetitivitätstest mit 1  $\mu\text{M}$  5-HT + 21  $\mu\text{M}$  Isopropylphenol, 3  $\mu\text{M}$  5-HT + 21  $\mu\text{M}$  Isopropylphenol, 30  $\mu\text{M}$  5-HT + 21  $\mu\text{M}$  Isopropylphenol. Dargestellt ist die Potenzierung des Peakstroms.

### 3.3.9 Phenol: Konzentrations-Wirkungskurve

Es wurden nur zwei Konzentrationen des Phenols gemessen, die deutlich zeigten, dass Phenol, ähnlich wie das Isopropylphenol, am 5-HT<sub>3A</sub> Rezeptor wirkt (Abb. 61).

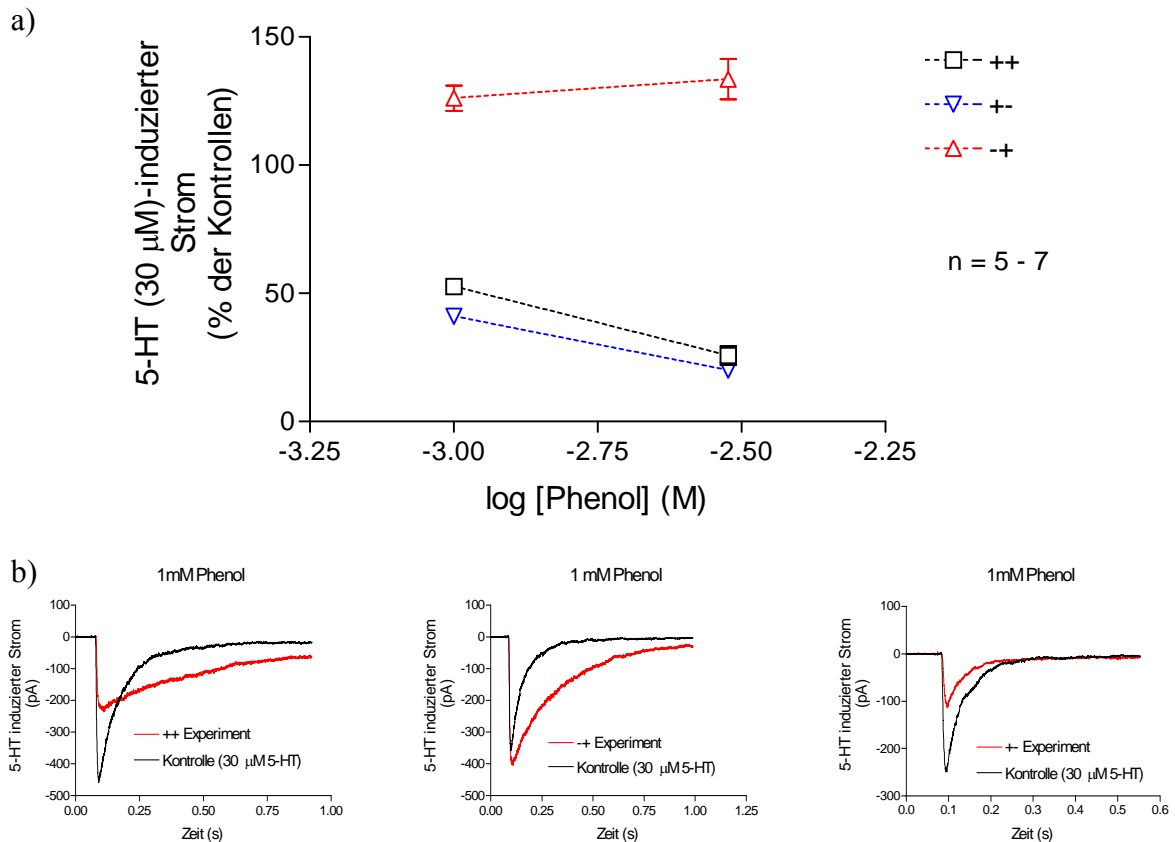


Abbildung 61: a) Konzentrations-Wirkungskurve von Phenol (Mittelwerte  $\pm$  SEM); schwarz: ++ Applikation, blau: +-, rot: -+ Modus; Kontrolle: 30  $\mu$ M 5-HT; b) Beispielstromspuren für die Konzentration von 1 mM.

Bei den ++ und +- Applikationsmodi kam es zur Inhibierung, während es bei der -+ Applikation zu einer Potenzierung der 5-HT induzierter Ströme kam. Allerdings lag der IC<sub>50</sub>-Wert der Inhibierung bei 1 mM Phenol. Dies entspricht fast dem 60 fachen IC<sub>50</sub>-Wert der Inhibierung von Isopropylphenol.

Auch bei den Aktivierungs- und Desensibilisierungszeitkonstanten ließen sich Parallelen zu den Propofol- und Isopropylphenoleffekten ablesen.

Im +- Modus war kein Einfluss auf die Aktivierungs- und Desensibilisierungszeitkonstante erkennbar. Im ++ Modus allerdings kam es zu einer sehr starken Verlangsamung der Aktivierungs-, als auch der Desensibilisierungszeitkonstanten. Die Aktivierungszeitkonstanten wurden mit zunehmender Konzentration noch langsamer, die Desensibi-

lisierungszeitkonstanten hingegen wurden mit steigender Konzentration schneller (Abb. 62).

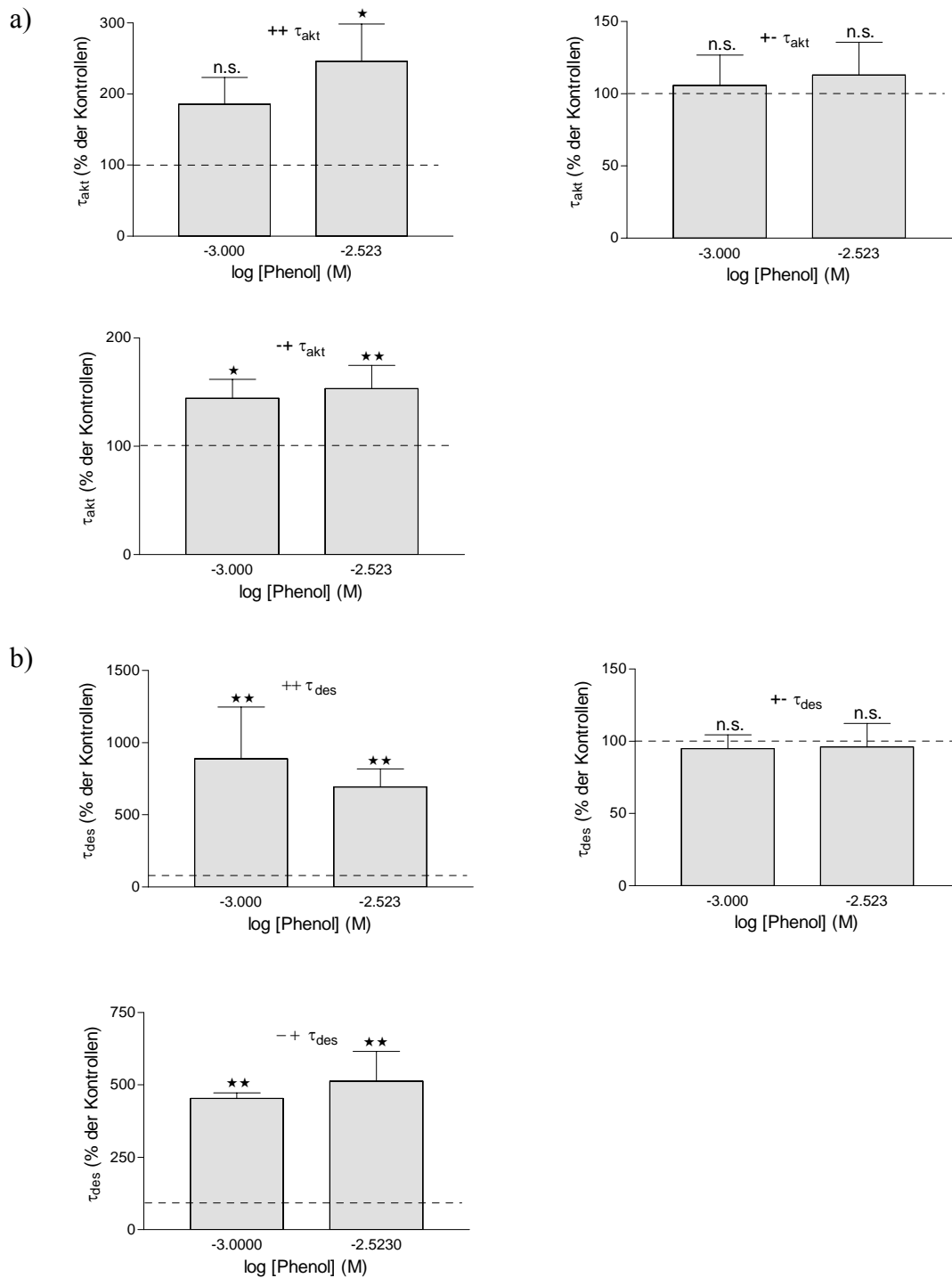
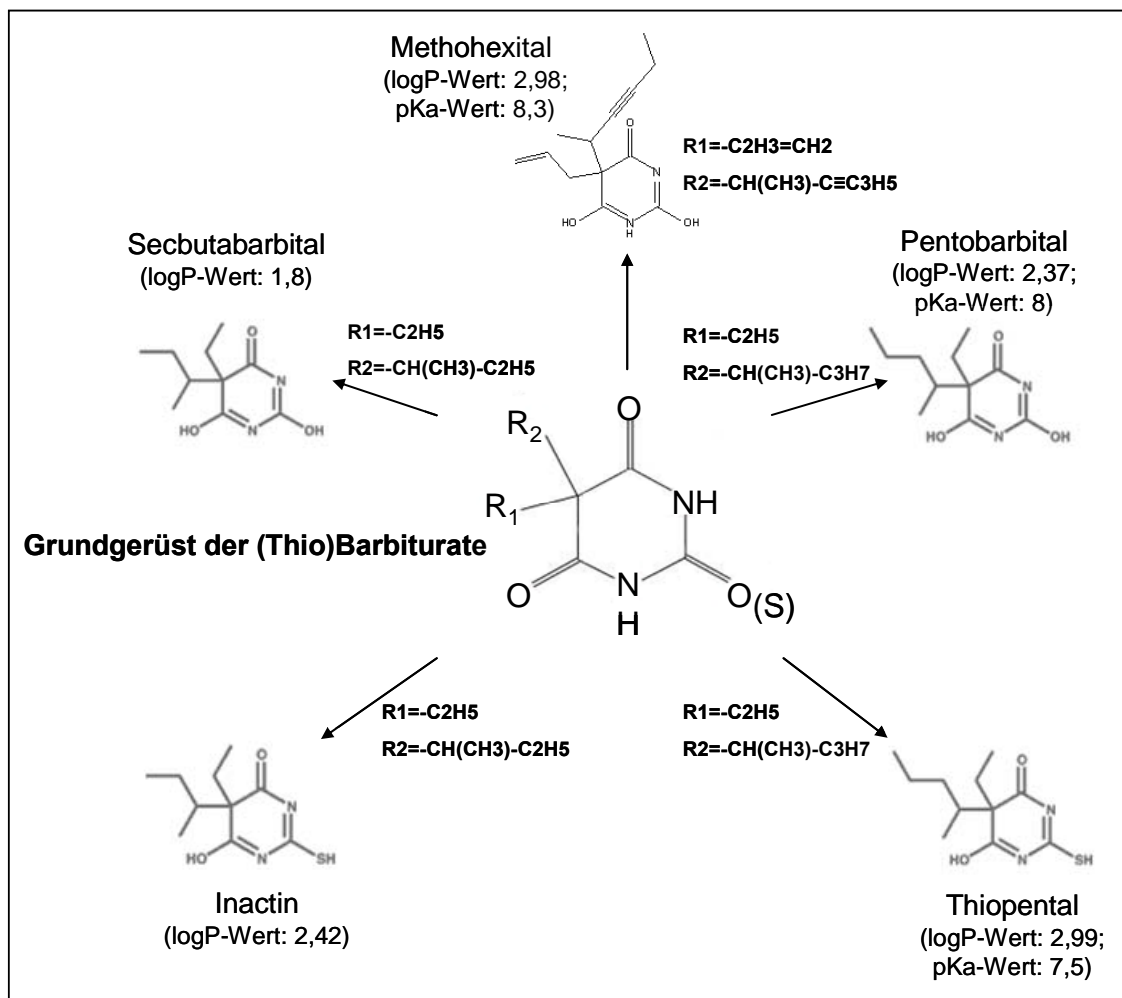


Abbildung 62: a) Aktivierungs- ( $\tau_{akt}$ ) und b) Desensibilisierungszeitkonstanten ( $\tau_{akt}$ ) des Phenoleffektes (Mittelwerte + SEM) am 5-HT<sub>3A</sub> Rezeptor. \* =  $p \leq 0,05$ , gepaarter t-test, basierend auf Absolutwerten, \*\* =  $p \leq 0,01$ , gepaarter t-test, basierend auf Absolutwerten.

### 3.4 Effekte von Barbituraten und deren Derivaten am 5-HT<sub>3A</sub> Rezeptor

Barbiturate wie Methohexital und Thiopental werden im klinischen Alltag zur Narkoseeinleitung verwendet. Ein häufiges Problem stellt das postoperative Erbrechen (PONV) dar, welches unter anderem über den 5-HT<sub>3</sub> Rezeptor vermittelt wird. Um den Wirkmechanismus der Barbiturate an diesem Rezeptor zu verstehen bzw. auch die Ursache des postoperativen Erbrechens weiter charakterisieren zu können, wurden die Effekte dieser Präparate am 5-HT<sub>3A</sub> Rezeptor charakterisiert. Um ähnliche Effekte bestimmten Molekularstrukturen zuordnen zu können, wurden auch die Effekte strukturähnlicher Substanzen am 5-HT<sub>3A</sub> Rezeptor charakterisiert und mit denen der oben genannten Substanzen verglichen.

Alle charakterisierten Substanzen im Überblick:

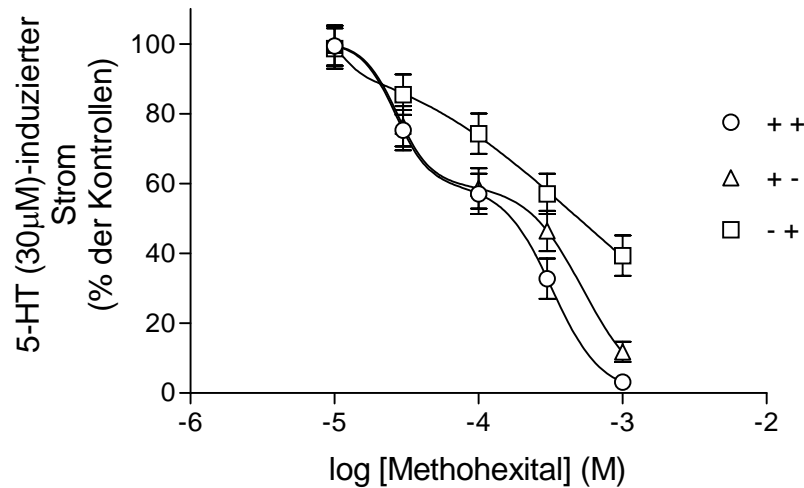




### 3.4.1 Methohexital: Konzentrations-Wirkungskurve

Die Konzentrations-Wirkungskurven von Methohexital ließen sich durch biphasische Fits am besten beschreiben (Abb. 63).

a)



b)

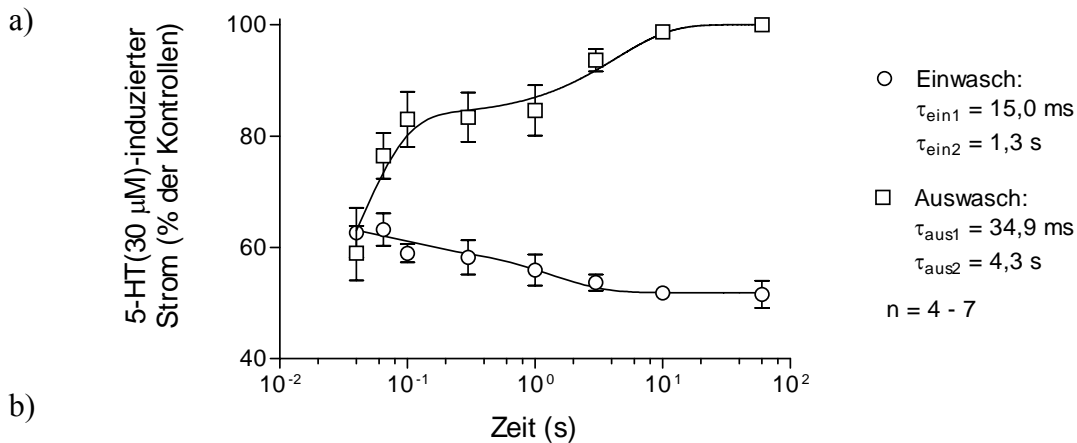
	++	+-	-+
Best-fit values			
SPAN	100.5	100.6	108.6
BOTTOM (Constant)	0.0	0.0	0.0
TOP (Constant)	100.0	100.0	100.0
FRACTION1	0.4085	0.4063	0.07350
LOGEC50_1	-4.577	-4.565	-4.928
HILLSLOPE1	3.684	3.661	7.000
LOGEC50_2	-3.488	-3.276	-3.312
HILLSLOPE2	2.572	2.206	0.6306

Abbildung 63: a) Konzentrations-Wirkungskurve von Methohexital (Mittelwerte  $\pm$  SEM); Kreis: ++ Applikation, Dreiecke: +-, Quadrate: -+ Modus; Kontrolle: 30  $\mu$ M 5-HT; b) Fitparameter.

Die  $IC_{50}$ -Werte lagen bei der ++ Applikation bei  $IC_{50}(1) = 26,5 \mu$ M,  $IC_{50}(2) = 325 \mu$ M; im +- Modus bei  $IC_{50}(1) = 27,2 \mu$ M,  $IC_{50}(2) = 530 \mu$ M und im -+ Modus bei  $IC_{50}(1) = 11,8 \mu$ M,  $IC_{50}(2) = 487 \mu$ M. Die Konzentrations-Wirkungskurve zeigte einen biphasischen Verlauf.

### 3.4.2 Methohexital: Einwasch und Auswasch

Um die Kinetiken der Methohexitaleffekte zu bestimmen, wurde der Einwasch und der Auswasch bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  Methohexital bestimmt. Für den Einwasch wurde der ++ Applikationsmodus gewählt (Abb. 64).



b)

Einwasch:			
Best-fit values		95% Confidence Intervals	
YMAX1	8.798	YMAX1	2.164 to 15.43
K1	0.7590	K1	-0.9997 to 2.518
PLATEAU	51.89	PLATEAU	47.42 to 56.35
K2	66.91	K2	-2.629 to 136.4

Auswasch:			
Best-fit values		95% Confidence Intervals	
YMAX1	16.45	YMAX1	9.625 to 23.27
K1	0.2322	K1	-0.1124 to 0.5769
PLATEAU (Constant)	20.00	K2	17.45 to 38.66
K2	28.06		

Abbildung 64: a) Einwasch (Kreise) und Auswasch (Quadrate) von 100  $\mu\text{M}$  Methohexital im ++ Modus. Kontrollen (30  $\mu\text{M}$  5-HT). Die ersten 32 ms waren nicht auflösbar. Die Effekte wurden durch zwei Zeitkonstanten am besten charakterisiert; b) Fitparameter.

Sowohl die Einwasch- als auch die Auswascheffekte konnten durch zwei Zeitkonstanten charakterisiert werden. Beim Einwasch waren allerdings nach 32 ms schon ca. 80 % des Maximaleffektes abgeschlossen, wohingegen beim Auswasch nach dieser kurzen Zeit nur eine sehr geringe Reduzierung der Inhibierung festzustellen war.

Beim Einwasch des Methohexitaleffektes wurde deutlich, dass es schon nach der kürzesten Einwaschzeit zu einer Beschleunigung der Desensibilisierung von 50 % kam. Die Aktivierungszeitkonstanten wurden hingegen nicht beeinflusst (Abb. 65).

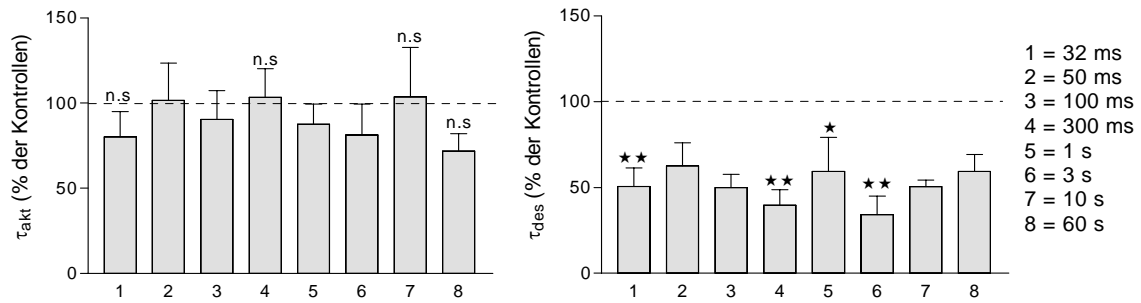


Abbildung 65: Aktivierungs- ( $\tau_{\text{akt}}$ ) und Desensibilisierungszeitkonstanten ( $\tau_{\text{des}}$ ) während des Einwasches (Mittelwerte  $\pm$  SEM); \*\* =  $p \leq 0,01$ , \* =  $p \leq 0,05$ , n.s.; gepaarter t-test.

### 3.4.3 Methohexital: Konzentrationssprünge

Zur weiteren Charakterisierung wurden die Konzentrationssprungexperimente bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  und 300  $\mu\text{M}$  Methohexital durchgeführt (Abb. 66 + Abb. 68).

#### 3.4.3.1 Konzentrationssprünge: 100 $\mu\text{M}$ Methohexital

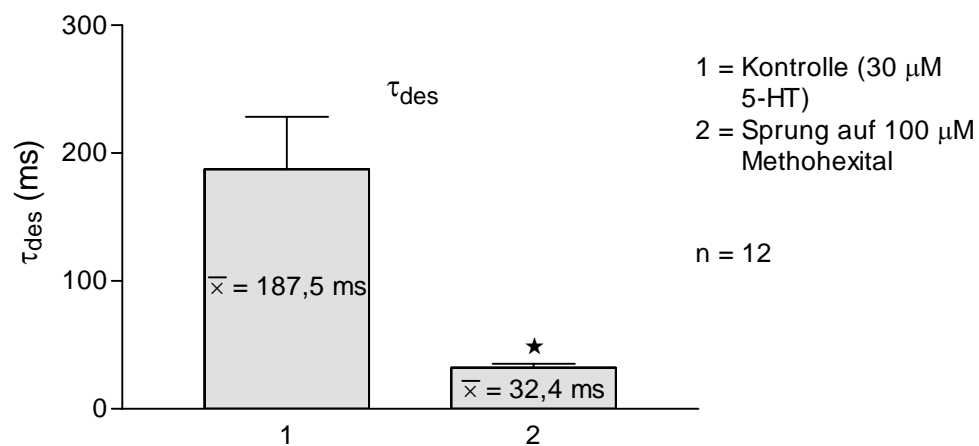


Abbildung 66: Desensibilisierungszeitkonstanten während der Konzentrationssprünge (Mittelwerte + SEM); \* =  $p \leq 0,05$ , gepaarter t-test, basierend auf Absolutwerten.

Bei den Konzentrationssprüngen mit 100  $\mu\text{M}$  Methohexital zeigte sich, dass die Kanäle innerhalb von 32 ms desensibilisieren (Abb. 66). Sie ließen sich am besten durch eine monoexponentielle Funktion beschreiben, was darauf schließen lässt, dass in den ersten 32 ms ein einzelner schneller Effekt zum Tragen kommt.

## Beispielstromspuren:

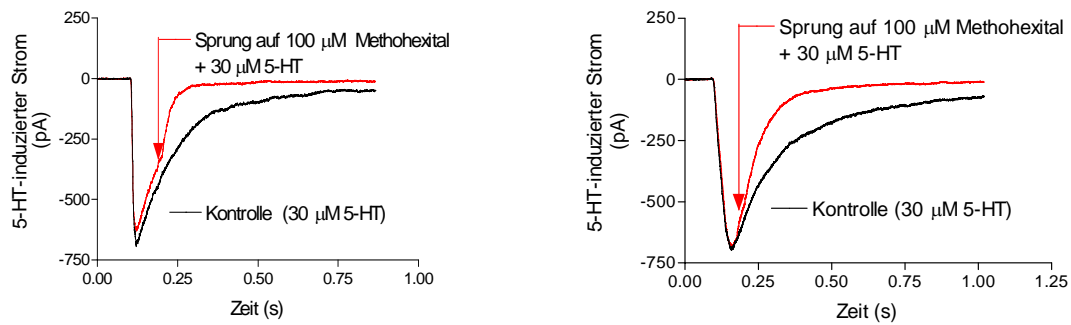


Abbildung 67: Konzentrationssprungexperimente mit 100  $\mu$ M Methohexital. Schwarz: Kontrolle (30  $\mu$ M 5-HT); rot: 100  $\mu$ M Methohexital + 30  $\mu$ M 5-HT.

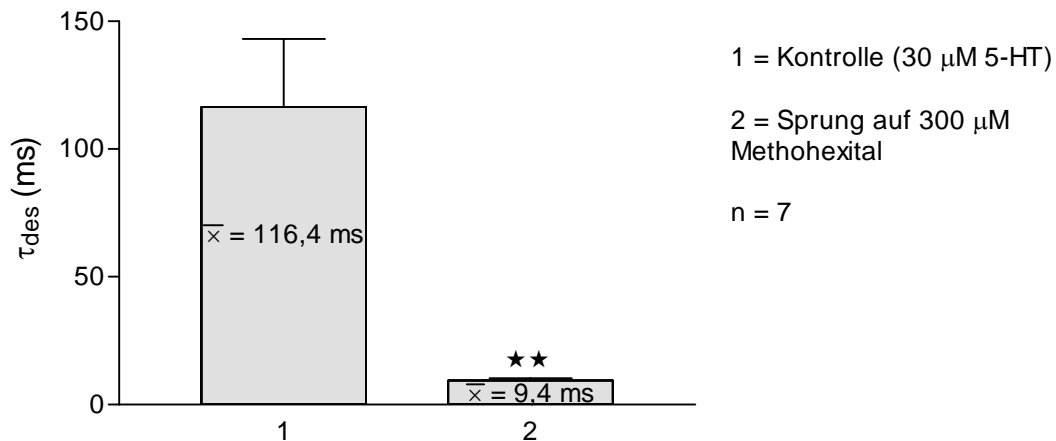
3.4.3.2 Konzentrationssprünge: 300  $\mu$ M Methohexital

Abbildung 68: Desensibilisierungszeitkonstanten während der Konzentrationssprünge auf 300  $\mu$ M Methohexital (Mittelwerte + SEM); \*\* =  $p \leq 0.01$ , gepaarter t-test, basierend auf Absolutwerten.

Bei den Konzentrationssprüngen mit 300  $\mu$ M Methohexital desensibilisierten die Kanäle innerhalb von 9,4 ms (Abb. 68+69), d.h. es konnte bei diesen beiden Konzentrationen von 100  $\mu$ M und 300  $\mu$ M eine Konzentrationsabhängigkeit festgestellt werden.

## Beispielstromspuren:

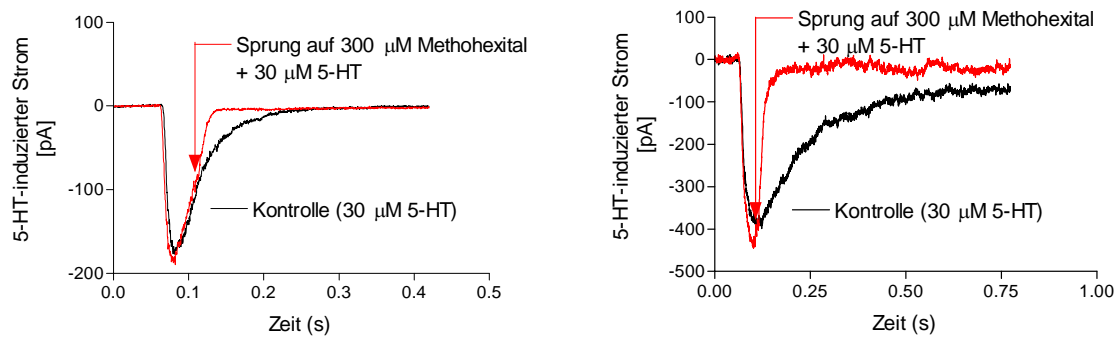


Abbildung 69: Konzentrationssprungexperimente auf 300  $\mu$ M Methohexital: schwarz: Kontrolle (30  $\mu$ M 5-HT); rot: 300  $\mu$ M Methohexital + 30  $\mu$ M 5-HT.

### 3.4.4 Thiopental: Konzentrations-Wirkungskurve

Thiopental ist ebenfalls ein Barbiturat, welches in der Klinik oft zur Narkoseeinleitung verwendet wird. Es zeigte folgende Wirkung auf den 5-HT<sub>3A</sub> Rezeptor (Abb. 70):

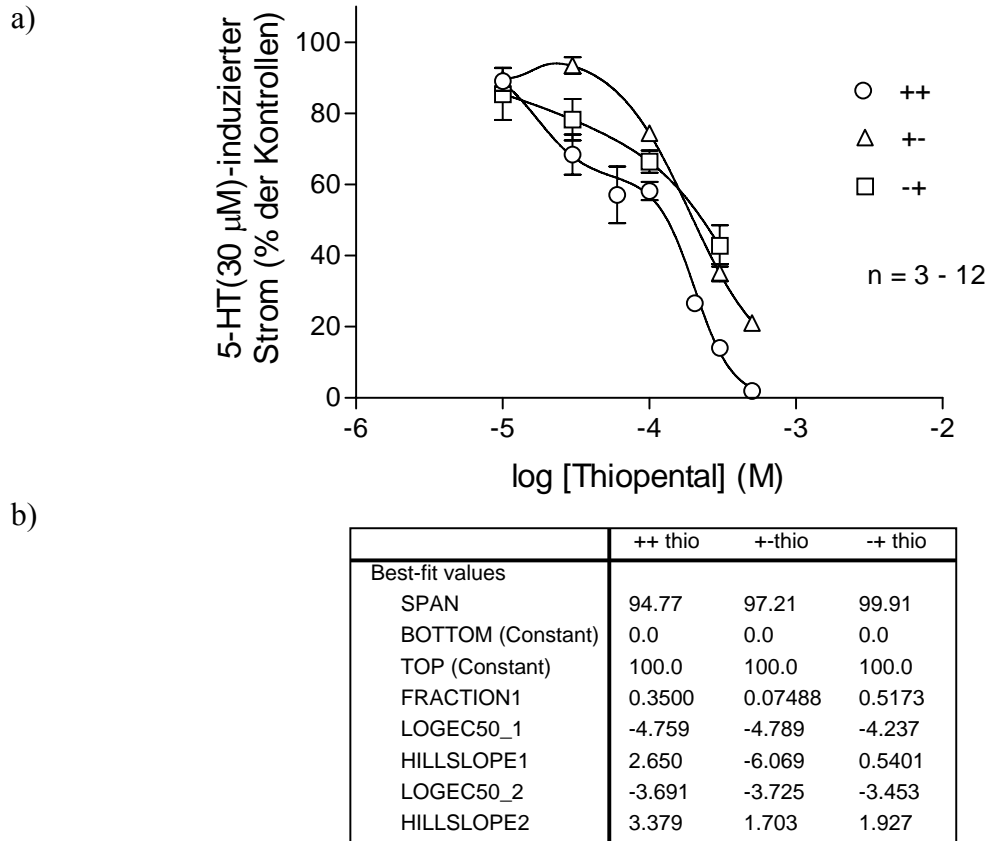
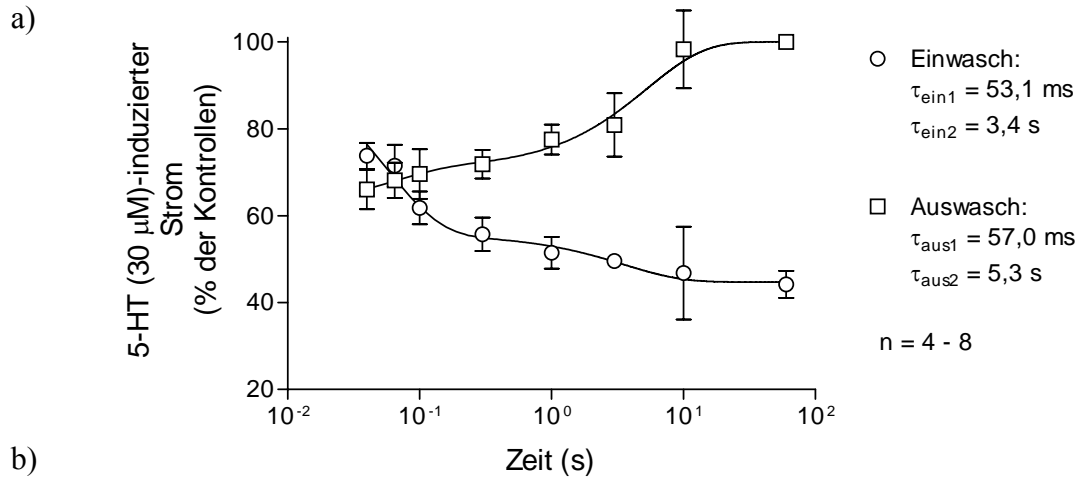


Abbildung 70: a) Konzentrations-Wirkungskurve von Thiopental (Mittelwerte  $\pm$  SEM); Kreis: ++ Applikation, Dreiecke: +-, Quadrate: -+ Modus; Kontrolle: 30  $\mu$ M 5-HT, b) Fitparameter.

Auch die Konzentrations-Wirkungskurven von Thiopental ließen sich mit einer biphasischen Funktion am besten darstellen. Die IC<sub>50</sub>-Werte lagen für die ++ Applikation bei IC<sub>50</sub>(1) = 17,4  $\mu$ M, IC<sub>50</sub>(2) = 203,7  $\mu$ M, für die +- Applikation bei IC<sub>50</sub>(1) = 16,3  $\mu$ M, IC<sub>50</sub>(2) = 188,4  $\mu$ M und für die -+ Applikation bei IC<sub>50</sub>(1) = 58  $\mu$ M, IC<sub>50</sub>(2) = 352  $\mu$ M.

### 3.4.5 Thiopental: Einwasch und Auswasch

Der Einwasch und der Auswasch (Abb. 71) wurden mit einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  Thiopental durchgeführt. Für den Einwasch wurde die ++ Applikation gewählt.



b)

Einwasch:

Best-fit values		95% Confidence Intervals	
YMAX1	10.91	YMAX1	-0.07624 to 21.89
K1	0.2825	K1	-0.5883 to 1.153
PLATEAU	44.75	PLATEAU	38.15 to 51.35
K2	18.76	K2	8.333 to 29.19

Auswasch:

Best-fit values		95% Confidence Intervals	
YMAX1	9.922	YMAX1	-37.67 to 57.51
K1	17.52	K1	-83.37 to 118.4
PLATEAU	60.91	PLATEAU	11.31 to 110.5
K2	0.1883	K2	-0.0001095 to 0.3768

Abbildung 71: a) Einwasch (Kreise) und Auswasch (Quadrate) von 100  $\mu\text{M}$  Thiopental (Mittelwerte  $\pm$  SEM). Kontrollen (30  $\mu\text{M}$  5-HT). Die ersten 32 ms waren nicht auflösbar. Die Effekte wurden durch zwei Zeitkonstanten am besten charakterisiert; b) Fitparameter.

In beiden Kinetiken ließen sich zwei Zeitkonstanten erkennen. Sowohl der Einwasch, als auch der Auswasch von Thiopental waren langsamer als der Ein- und Auswasch von Methohexital. Auch durch die Thiopentalapplikation konnte kein Einfluss auf die Aktivierungszeitkonstanten festgestellt werden. Die Desensibilisierungszeitkonstanten wurden allerdings wie auch nach Methohexitalapplikation um 50 % beschleunigt (Abb. 72).

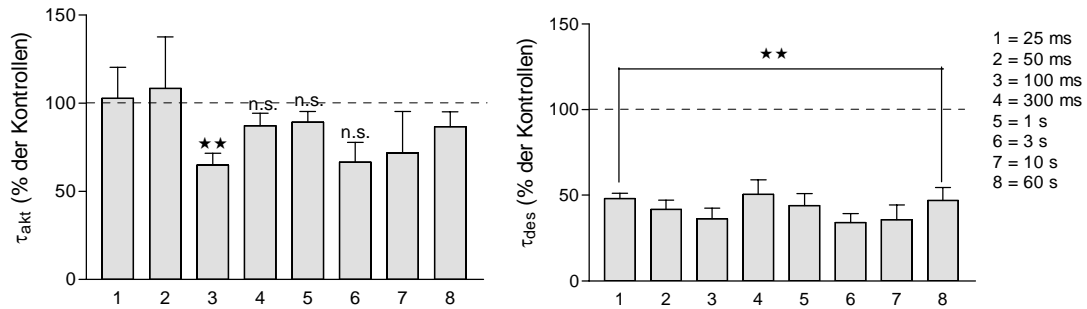


Abbildung 72: Aktivierungs- ( $\tau_{\text{akt}}$ ) und Desensibilisierungszeitkonstanten ( $\tau_{\text{des}}$ ) während des Einwasches (Mittelwerte + SEM); \*\* =  $p \leq 0,01$ , n.s.; gepaarter t-test.

### 3.4.6 Thiopental: Konzentrationssprünge

Die Konzentrationssprünge wurden mit 100  $\mu\text{M}$  und 300  $\mu\text{M}$  durchgeführt (Abb. 73 + Abb. 76).

#### 3.4.6.1 Konzentrationssprünge: 100 $\mu\text{M}$ Thiopental

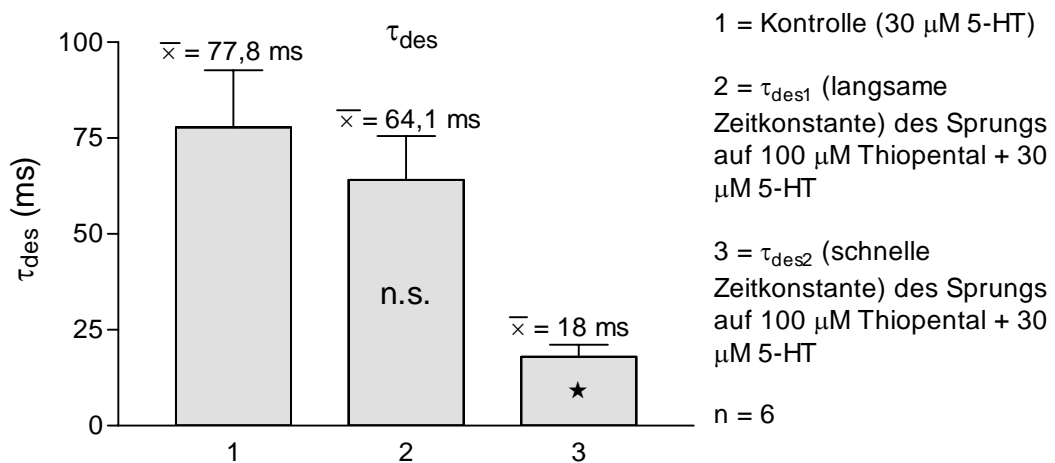


Abbildung 73: Desensibilisierungszeitkonstanten während der Konzentrationssprünge mit 100  $\mu\text{M}$  Thiopental (Mittelwerte + SEM); \* =  $p \leq 0,05$ , gepaarter t-test, basierend auf Absolutwerten.

Die Desensibilisierungskinetiken ließen sich durch biexponentielle Fits beschreiben. Ein Vergleich der jeweiligen Amplituden machte deutlich, dass jeder Prozess 50% des Effektes ausmachte (Abb. 74).



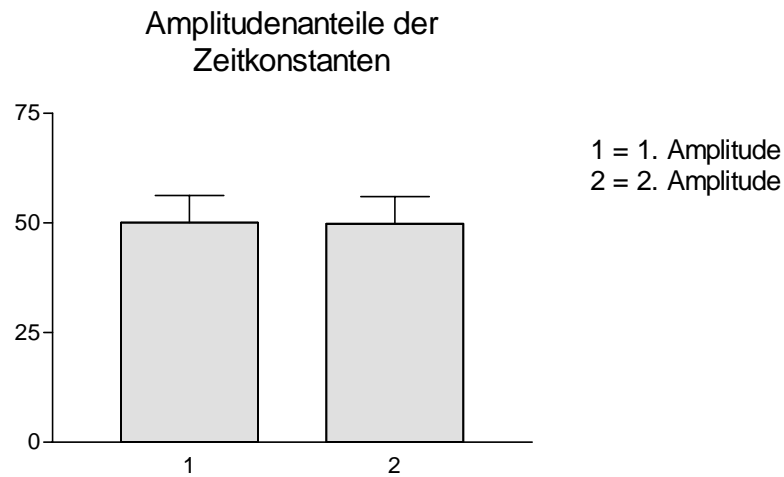


Abbildung 74: Amplitudenanteile der Zeitkonstanten der Konzentrationssprünge mit 100  $\mu\text{M}$  Thiopental.

Beispielstromspuren:

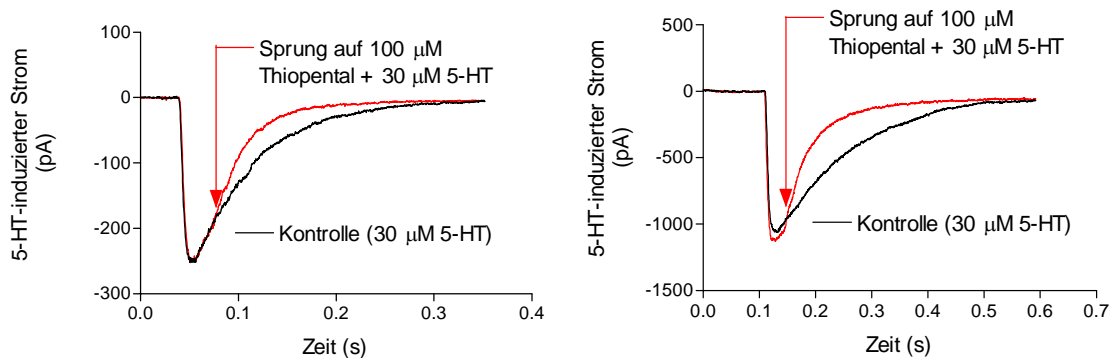


Abbildung 75: Konzentrationssprungexperimente auf 100  $\mu\text{M}$  Thiopental. Schwarz: Kontrolle (30  $\mu\text{M}$  5-HT); rot: 100  $\mu\text{M}$  Thiopental + 30  $\mu\text{M}$  5-HT.

#### 3.4.6.2 Konzentrationssprünge: 300 $\mu\text{M}$ Thiopental

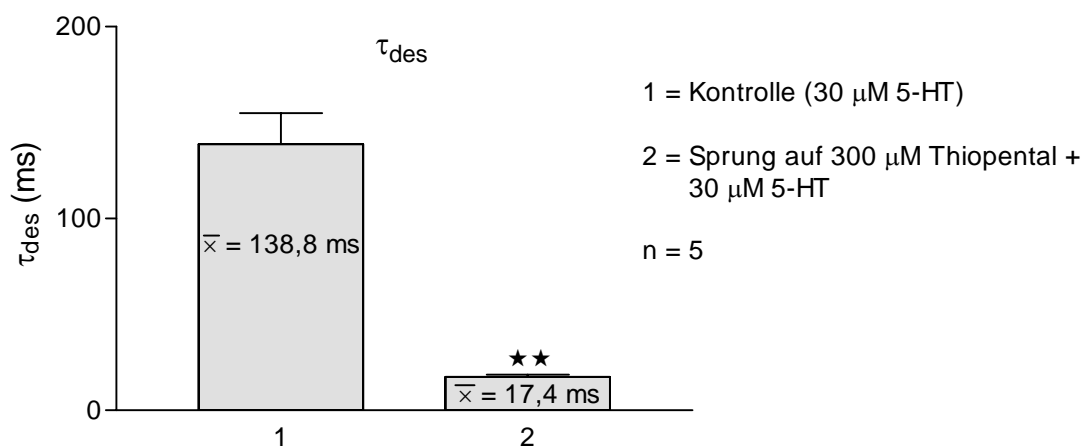


Abbildung 76: Desensibilisierungszeitkonstanten während der Konzentrationssprünge auf 300  $\mu\text{M}$  Thiopental (Mittelwerte + SEM); \*\* =  $p \leq 0,01$ , gepaarter t-test, basierend auf Absolutwerten.

Nach einem Konzentrationssprung auf 300  $\mu\text{M}$  Thiopental ließ sich nur noch eine Zeitkonstante mittels einer monoexponentiellen Funktion bestimmen. Diese ist mit 17,4 ms der schnellen Zeitkonstante von 18 ms nach einem Sprung auf 100  $\mu\text{M}$  Thiopental sehr ähnlich. Es war folglich keine konzentrationsabhängige Beschleunigung mehr möglich.

Beispielstromspuren:

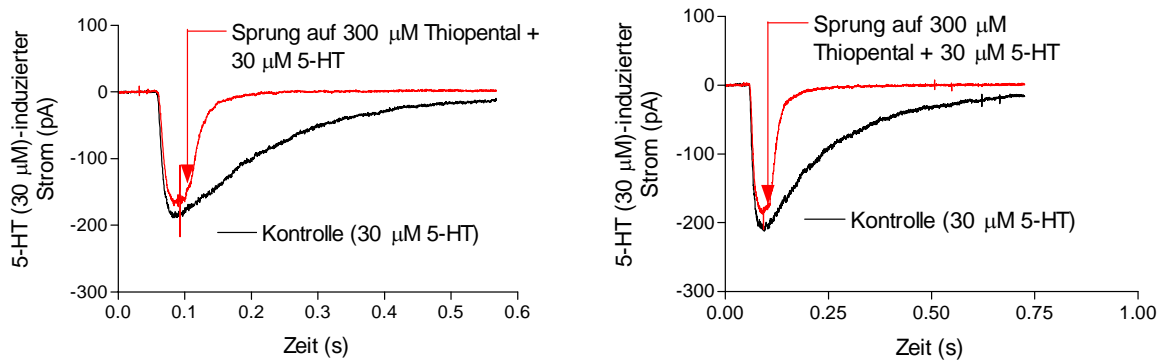
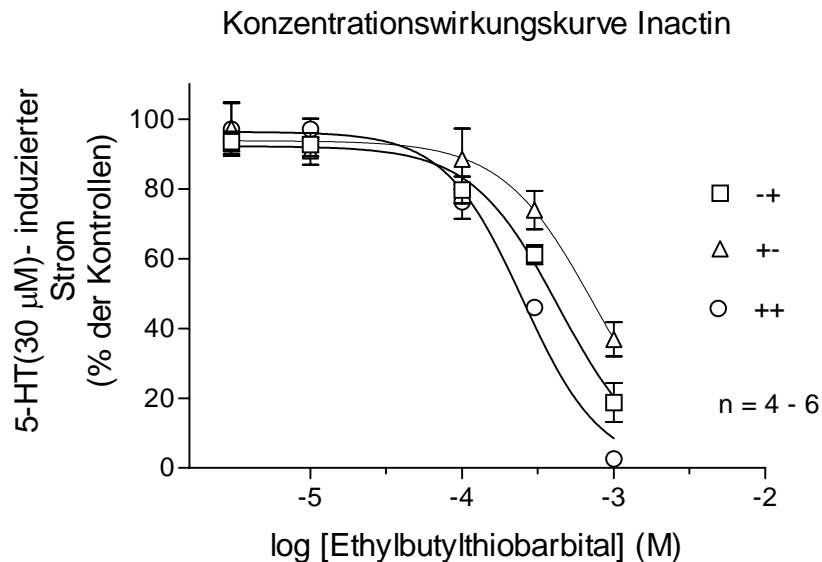


Abbildung 77: Konzentrationssprungexperimente auf 300  $\mu\text{M}$  Thiopental: Schwarz: Kontrolle (30  $\mu\text{M}$  5-HT); rot: 300  $\mu\text{M}$  Thiopental + 30  $\mu\text{M}$  5-HT.

### 3.4.7 Inactin (Ethylbutylthiobarbital): Konzentrations-Wirkungskurve

Da sich Ethylbutylthiobarbital strukturell nur durch eine Methylgruppe von Thiopental unterscheidet, bot es sich an, diese Substanz bei einer Strukturanalyse einzusetzen. Dabei sollten bestimmte Effekte, die diese Substanzen am 5-HT<sub>3A</sub> Rezeptor auslösen, bestimmten Strukturen zugeordnet werden.

a)



b)

	++	+-	-+
Best-fit values			
BOTTOM (Constant)	0.0	0.0	0.0
TOP	96.34	92.23	97.59
LOGEC50	-3.600	-3.363	-2.325
HILLSLOPE	-1.689	-1.510	-0.7438
EC50	0.0002511	0.0004339	0.004727

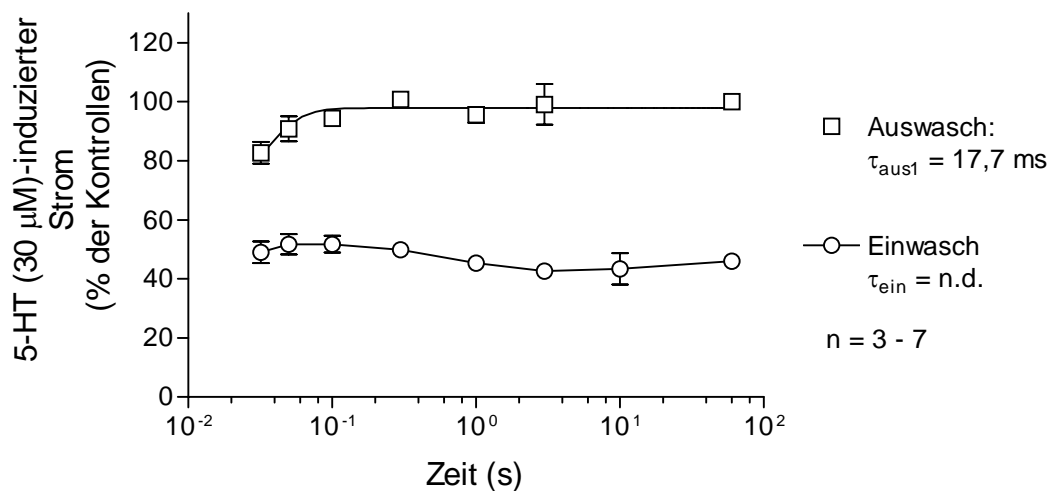
Abbildung 78: a) Konzentrations-Wirkungskurve von Inactin (Mittelwerte  $\pm$  SEM); Kreis: ++ Applikation, Dreiecke: +-, Quadrate: -+ Modus; Kontrolle: 30  $\mu$ M 5-HT, b) Fitparameter.

Die Konzentrations-Wirkungskurven von Inactin ließen sich im Gegensatz zu denen mit Thiopental mit einer monophasischen Funktion am besten darstellen. Die IC<sub>50</sub>-Werte lagen für die ++ Applikation bei 251  $\mu$ M, für die +- Applikation bei 740  $\mu$ M und für die -+ Applikation bei 4727  $\mu$ M (Abb.78).

### 3.4.8 Inactin: Einwasch und Auswasch

Der Einwasch und der Auswasch (Abb. 79) wurden mit einer Konzentration von 300  $\mu\text{M}$  Inactin durchgeführt. Für den Einwasch wurde der ++ Modus gewählt.

a)



b)

Auswasch:

Best-fit values		95% Confidence Intervals	
YMAX	97.83	YMAX	95.16 to 100.5
K	56.60	K	45.42 to 67.78
HalfLife	0.01225	HalfLife	0.01526 to 0.01023

Abbildung 79: Einwasch (Kreise) und Auswasch (Quadrate) von 300  $\mu\text{M}$  Inactin (Mittelwerte  $\pm$  SEM). Kontrollen (30  $\mu\text{M}$  5-HT). Die ersten 32 ms waren nicht auflösbar. Der Auswasch wurde durch eine Zeitkonstante ( $\tau_{\text{aus1}} = 17,7 \text{ ms}$ ) charakterisiert.

Beim Einwasch von 300  $\mu\text{M}$  Inactin kam es schon nach 32 ms zu der bei dieser Konzentration maximal möglichen Inhibierung. Deshalb konnte die Zeitkonstante des Einwasches nicht charakterisiert werden. Der Auswasch erfolgte ebenfalls sehr schnell und war durch eine Zeitkonstante von 17,7 ms charakterisiert.

Auf die Aktivierungszeitkonstanten hatte Inactin keinen Einfluß, die Desensibilisierungszeitkonstanten wurden um 25 % beschleunigt (Abb. 80).

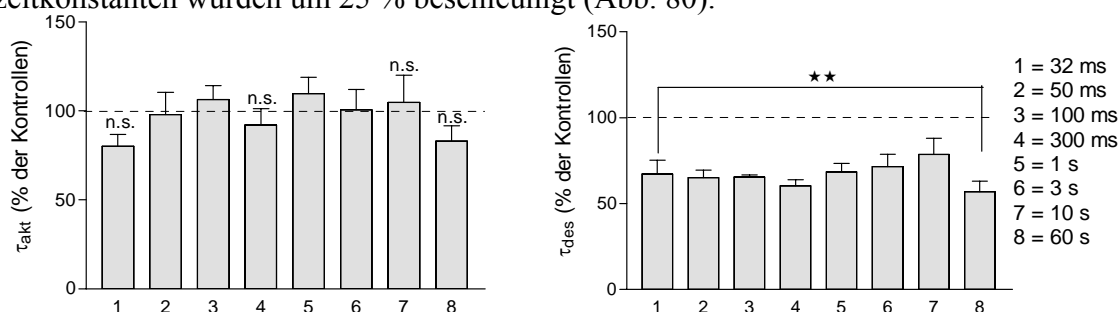


Abbildung 80: Aktivierungs- ( $\tau_{\text{akt}}$ ) und Desensibilisierungszeitkonstanten ( $\tau_{\text{des}}$ ) während des Einwasches (Mittelwerte + SEM); \*\* =  $p \leq 0,01$ , gepaarter t-test, basierend auf Absolutwerten.

### 3.4.9 Inactin: Konzentrationssprünge

Die Konzentrationssprünge wurden mit 300  $\mu\text{M}$  und 1000  $\mu\text{M}$  Inactin durchgeführt (Abb. 81 + Abb. 83).

#### 3.4.9.1 Konzentrationssprünge: 300 $\mu\text{M}$ Inactin

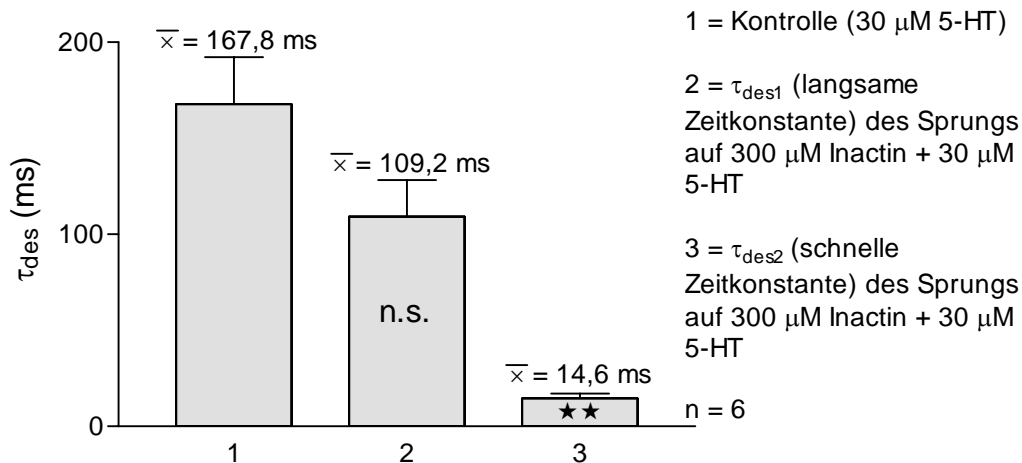


Abbildung 81: Desensibilisierungszeitkonstanten während der Konzentrationssprünge auf 300  $\mu\text{M}$  Inactin (Mittelwerte + SEM); \*\* =  $p \leq 0,01$ , gepaarter t-test, basierend auf Absolutwerten.

Die Konzentrationssprünge auf 300  $\mu\text{M}$  Inactin ließen sich nur durch biexponentielle Fits beschreiben. Sie waren durch eine schnelle und eine langsame Zeitkonstante charakterisiert. Der Vergleich ihrer jeweiligen Amplituden zeigte, dass die langsame Zeitkonstante 66,5 % und die schnelle Zeitkonstante 33,5 % dieses Effektes ausmachte. Hier kann man davon ausgehen, dass die schnelle Zeitkonstante den tatsächlichen Inactineffekt darstellt, wohingegen die langsame der Desensibilisierung entspricht, denn auch beim Einwasch war ein sehr schneller Effekt erkennbar.

Beispielstromspuren:

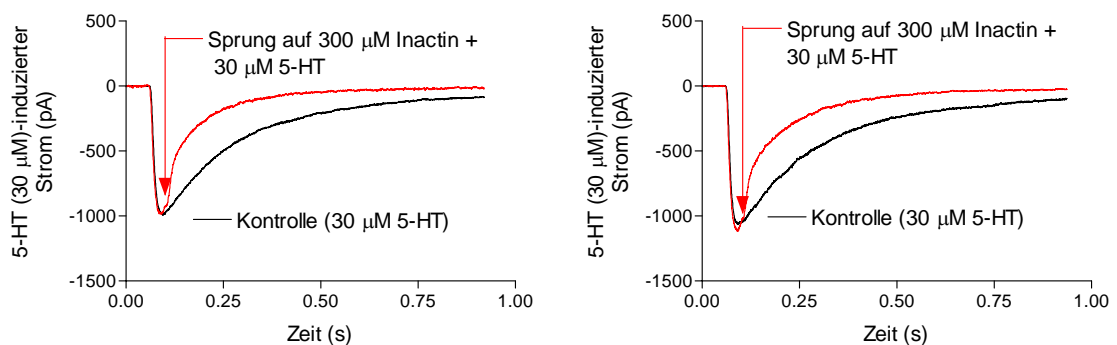


Abbildung 82: Konzentrationssprungexperimente auf 300  $\mu\text{M}$  Inactin. Schwarz: Kontrolle (30  $\mu\text{M}$  5-HT); rot: 300  $\mu\text{M}$  Inactin + 30  $\mu\text{M}$  5-HT.

### 3.4.9.2 Konzentrationssprünge: 1000 $\mu\text{M}$ Inactin

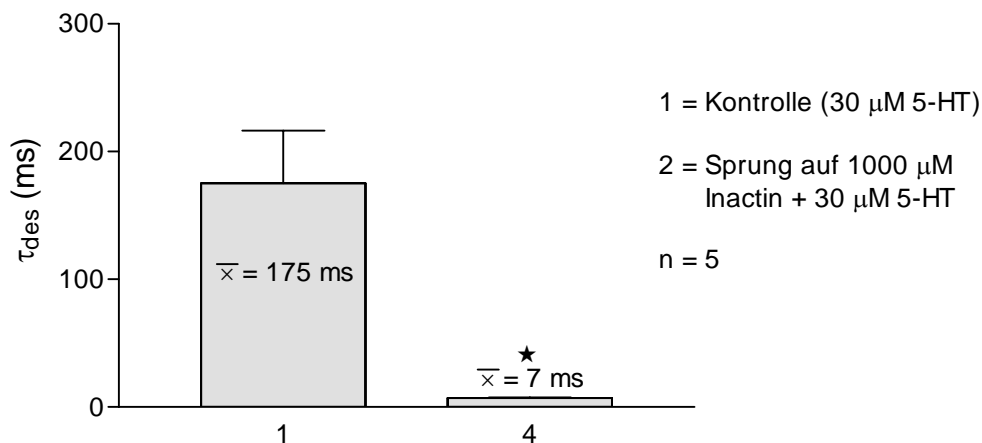


Abbildung 83: Desensibilisierungszeitkonstanten während der Konzentrationssprünge mit 300  $\mu\text{M}$  Inactin (Mittelwerte + SEM); \* =  $p \leq 0,01$ , gepaarter t-test, basierend auf Absolutwerten.

Die Konzentrationssprünge mit 1000  $\mu\text{M}$  Inactin ließen sich mittels einer mono-exponentiellen Funktion beschreiben. Die schnelle Zeitkonstante, die beim Konzentrationssprung mit 300  $\mu\text{M}$  Inactin beschrieben werden konnte, wurde durch eine Konzentrationserhöhung auf 1000  $\mu\text{M}$  Inactin um 50 % beschleunigt und der Effekt der Desensibilisierung wird völlig überlagert.

Beispielstromspuren:

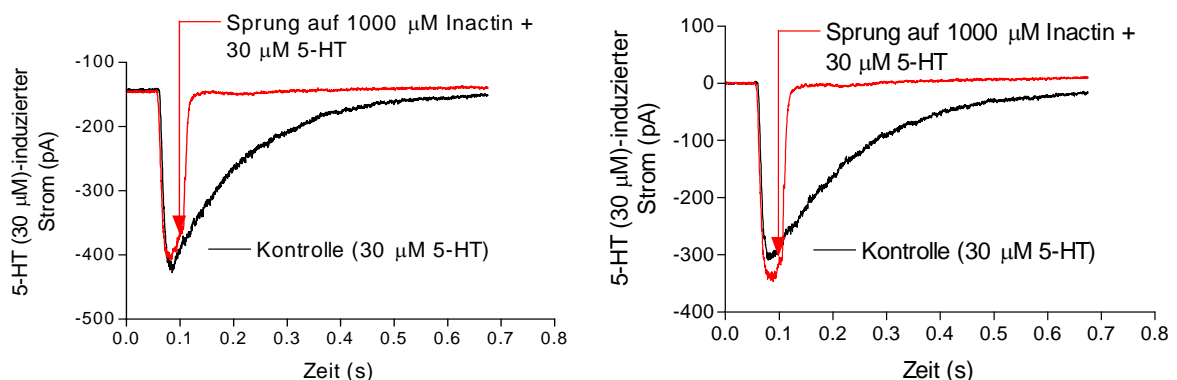
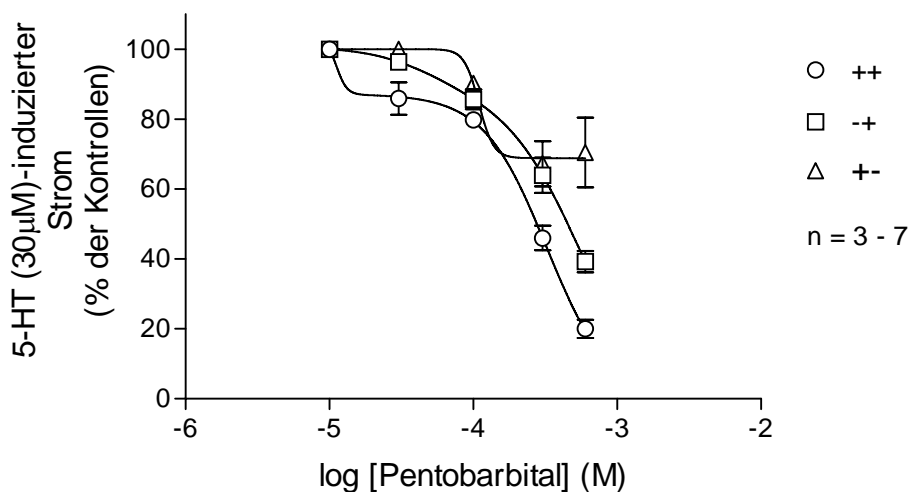


Abbildung 84: Konzentrationssprungexperimente auf 1000  $\mu\text{M}$  Inactin. Schwarz: Kontrolle (30  $\mu\text{M}$  5-HT); rot: 1000  $\mu\text{M}$  Inactin + 30  $\mu\text{M}$  5-HT.

### 3.4.10 Pentobarbital: Konzentrations-Wirkungskurve

Pentobarbital unterscheidet sich strukturell von Thiopental durch den Austausch des Schwefelatoms durch ein Sauerstoffatom. Es wurden Konzentrations-Wirkungskurven für alle drei Applikationsmodi erstellt (Abb. 85).



b)

	++	-+
Best-fit values		
SPAN	103.1	100.7
BOTTOM (Constant)	0.0	0.0
TOP (Constant)	100.0	100.0
FRACTION1	0.1548	0.1335
LOGEC50_1	-4.950	-4.290
HILLSLOPE1	12.13	1.829
LOGEC50_2	-3.493	-3.273
HILLSLOPE2	1.983	1.724

	+-
Best-fit values	
BOTTOM	68.82
TOP	100.0
LOGEC50	-3.960
HILLSLOPE	-8.597
EC50	0.0001095

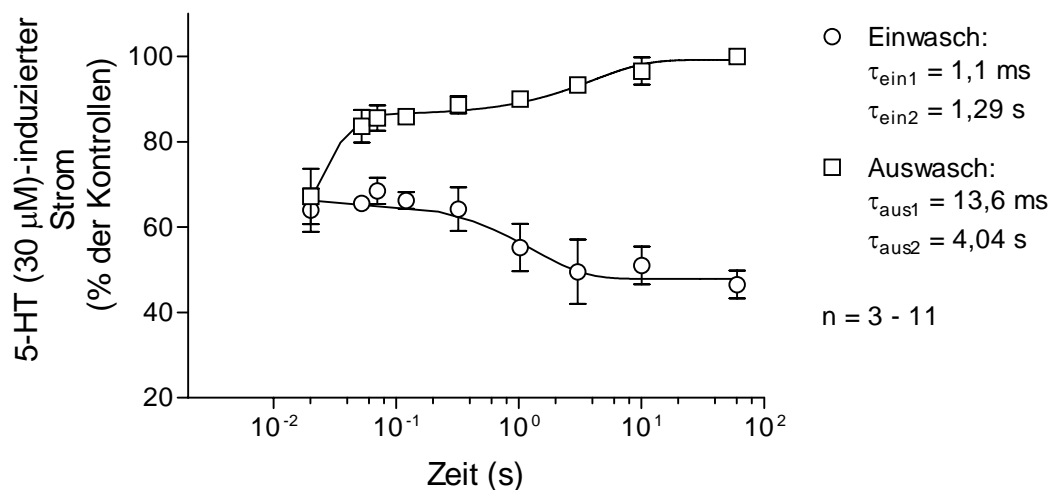
Abbildung 85: a) Konzentrations-Wirkungskurve von Pentobarbital (Mittelwerte  $\pm$  SEM); Kreis: ++ Applikation, Dreiecke: +-, Quadrate: -+ Modus; Kontrolle: 30  $\mu$ M 5-HT, b) Fitparameter.

Die ++ und -+ Konzentrations-Wirkungskurven von Pentobarbital ließen sich mit einer biphasischen Funktion darstellen. Die  $IC_{50}$ -Werte lagen für die ++ Applikation bei 11,2  $\mu$ M bzw. 321  $\mu$ M, für die -+ Applikation bei 51,3  $\mu$ M, bzw. 533  $\mu$ M. Die +- Konzentrations-Wirkungskurve ließ sich durch eine sigmoidale Funktion mit variablen Slope am besten beschreiben. Der  $IC_{50}$ -Wert lag bei 110  $\mu$ M.

### 3.4.11 Pentobarbital: Einwasch und Auswasch

Der Einwasch und Auswasch (Abb. 86) wurden mit einer Konzentration von 300  $\mu\text{M}$  Pentobarbital durchgeführt. Für den Einwasch wurde der ++ Modus gewählt.

a)



b)

Einwasch:			
Best-fit values		95% Confidence Intervals	
YMAX1	18.68	YMAX1	11.17 to 26.18
K1	0.7728	K1	-0.3602 to 1.906
PLATEAU	47.86	PLATEAU	43.00 to 52.71
K2	893.8	K2	-829600000 to 8.2960e+008

Auswasch:			
Best-fit values		95% Confidence Intervals	
YMAX1	12.88	YMAX1	8.070 to 17.69
K1	0.2474	K1	-0.08579 to 0.5806
YMAX2	86.29	YMAX2	83.42 to 89.16
K2	73.48	K2	53.50 to 93.46
Halflife_1	2.802	Halflife_1	-8.080 to 1.194
Halflife_2	0.009433	Halflife_2	0.01296 to 0.007416

Abbildung 86: a) Einwasch (Kreise) und Auswasch (Quadrate) von 300  $\mu\text{M}$  Pentobarbital (Mittelwerte  $\pm$  SEM). Kontrollen (30  $\mu\text{M}$  5-HT); b) Fitparameter.



Beim Einwasch von 300  $\mu\text{M}$  Pentobarbital waren nach der kürzesten Einwaschzeit ca. 60% der maximal möglichen Inhibierung erreicht. Der Auswasch erfolgte ebenfalls sehr schnell. Nach der kürzesten Auswaschzeit waren ca. 15 % der Inhibierung aus-gewaschen.

Auf die Aktivierungszeitkonstanten hatte Pentobarbital keinen signifikanten Einfluss, die Desensibilisierungszeitkonstanten wurden jedoch um 50 % beschleunigt (Abb. 87).

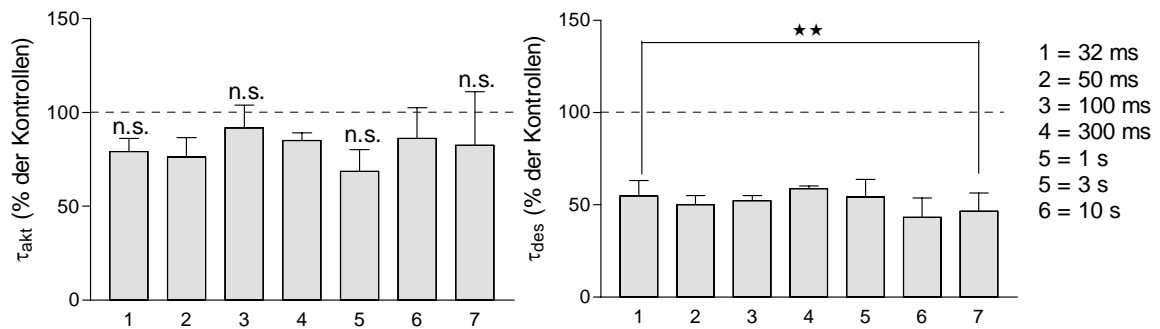


Abbildung 87: Aktivierungs- ( $\tau_{\text{akt}}$ ) und Desensibilisierungszeitkonstanten ( $\tau_{\text{des}}$ ) während des Einwasches (Mittelwerte + SEM); n.s./\*\* =  $p \leq 0,01$ , gepaarter t-test.

### 3.4.12 Pentobarbital: Konzentrationssprünge

Die Konzentrationssprünge wurden mit 300  $\mu\text{M}$  Pentobarbital durchgeführt (Abb. 88).

#### 3.4.12.1 Konzentrationssprünge: 300 $\mu\text{M}$ Pentobarbital

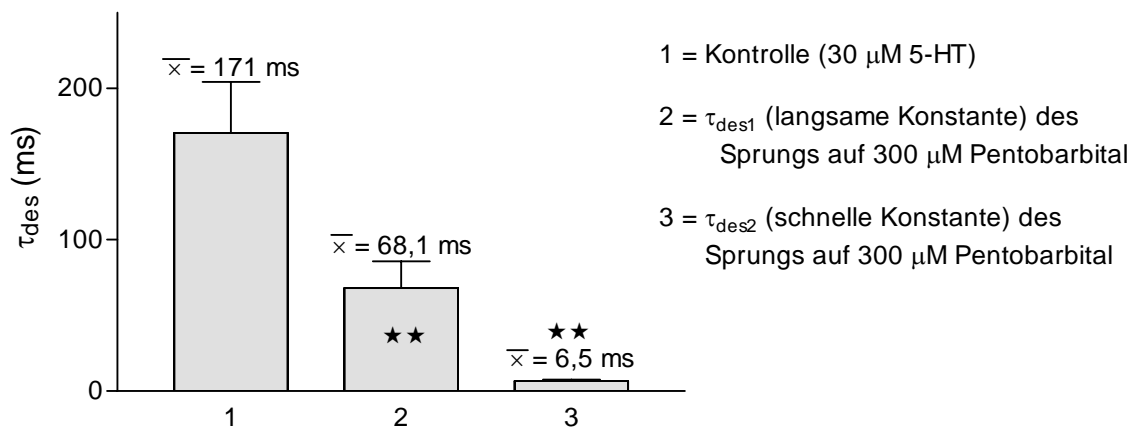


Abbildung 88: Desensibilisierungszeitkonstanten der Konzentrationssprünge mit 300  $\mu\text{M}$  Pentobarbital (Mittelwerte + SEM); \*\* =  $p \leq 0,01$ , gepaarter t-test, basierend auf Absolutwerten.

Die Konzentrationssprünge auf 300  $\mu\text{M}$  Pentobarbital ließen sich durch biexponentielle Funktionen am besten beschreiben. Sie waren durch eine schnelle und eine langsame Zeitkonstante charakterisiert. Der Vergleich ihrer jeweiligen Amplituden zeigte, dass die langsame Zeitkonstante 75% und die schnelle Zeitkonstante 25 % des Gesamteffektes ausmachte.

Beispielstromspuren:

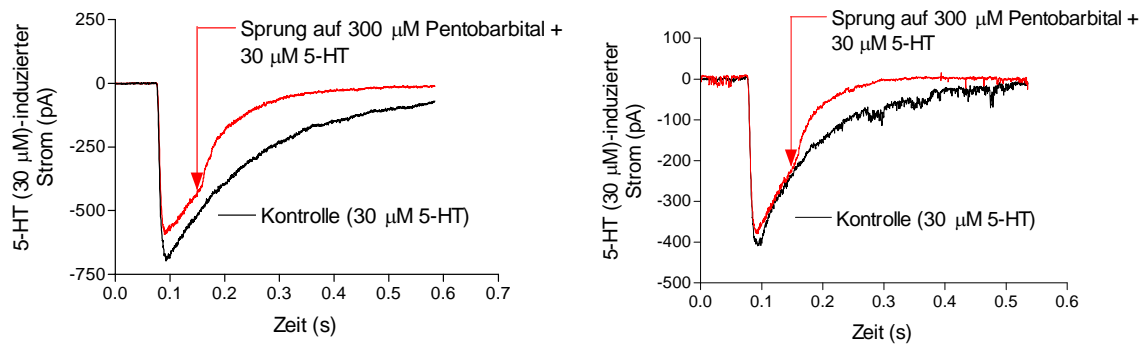


Abbildung 89: Konzentrationssprungexperimente auf 300  $\mu\text{M}$  Pentobarbital. Schwarz: Kontrolle (30  $\mu\text{M}$  5-HT); rot: 300  $\mu\text{M}$  Pentobarbital + 30  $\mu\text{M}$  5-HT.

### 3.4.13 Secbutabarbital: Konzentrations-Wirkungskurve

Secbutabarbital unterscheidet sich strukturell nur durch eine Methylgruppe von Pentobarbital. Es wurden Konzentrations-Wirkungskurven für alle drei Applikationsmodi erstellt (Abb. 90).

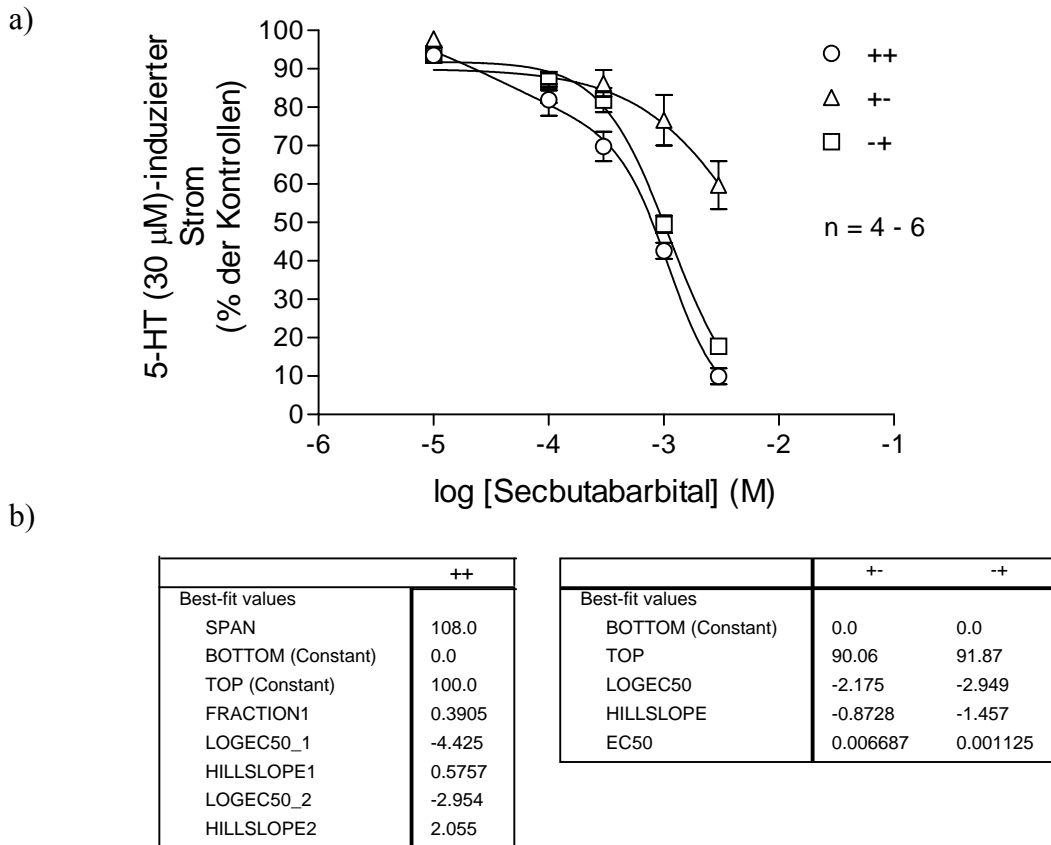


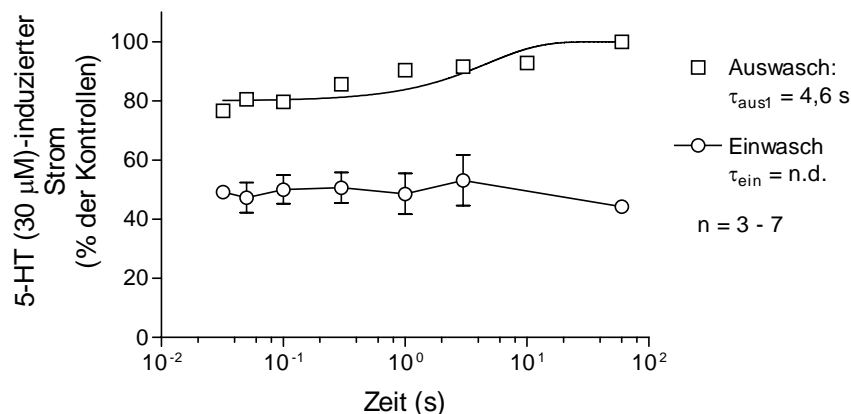
Abbildung 90: a) Konzentrations-Wirkungskurve von Secbutabarbital (Mittelwerte  $\pm$  SEM); Kreis: ++ Applikation, Dreiecke: +-, Quadrate: -+ Modus; Kontrolle: 30  $\mu$ M 5-HT, b) Fitparameter.

Die ++ Konzentrations-Wirkungskurven von Secbutabarbital ließ sich mit einer biexponentiellen Funktion am besten darstellen. Die -+ und +- Konzentrations-wirkungskurve ließen sich durch sigmoidale Funktionen mit variablen Slope am besten beschreiben. Die  $IC_{50}$ -Wert lagen für die ++ Applikation bei 37,6  $\mu$ M bzw. 1112  $\mu$ M, für die -+ Applikation bei 1125  $\mu$ M und für die +- Applikation bei 6683  $\mu$ M.

### 3.4.14 Secbutabarbital: Einwasch und Auswasch

Der Einwasch und der Auswasch (Abb. 91) wurden mit einer Konzentration von 1000  $\mu\text{M}$  Secbutabarbital durchgeführt. Für den Einwasch wurde der ++ Modus gewählt.

a)



b)

Einwasch: Punkt zu Punkt-Verbindung

Auswasch:			
Best-fit values		95% Confidence Intervals	
YMAX1 (Constant)	60.00		
K1	0.2149	K1	-5.625 to 6.055
PLATEAU (Constant)	80.00	K2	-8.624 to 9.057
K2	0.2164		

Abbildung 91: a) Einwasch (Kreise) und Auswasch (Quadrate) von 1000  $\mu\text{M}$  Secbutabarbital (Mittelwerte  $\pm$  SEM). Kontrollen (30  $\mu\text{M}$  5-HT); b) Fitparameter.

Beim Einwasch von 1000  $\mu\text{M}$  Secbutabarbital wurde schon nach der kürzesten Einwaschzeit die maximal mögliche Inhibierung erreicht, d.h. es konnte keine Zeitkonstante ermittelt werden. Der Auswaschzeitkonstante konnte mit 4,6 s bestimmt werden. 1000  $\mu\text{M}$  Secbutabarbital zeigten keinen Einfluss auf die Aktivierungszeitkonstanten, die Desensibilisierungszeitkonstanten wurden zeitabhängig beschleunigt, nach 1s Einwaschzeit um 50 % wie bei Pentobarbital.

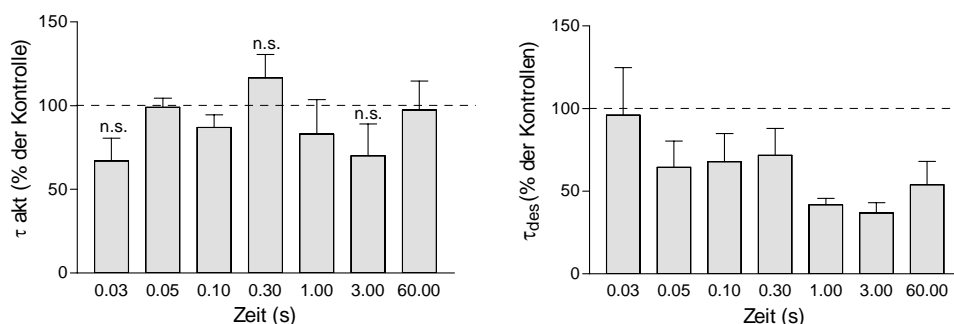


Abbildung 92: Aktivierungs- ( $\tau_{\text{akt}}$ ) und Desensibilisierungszeitkonstanten ( $\tau_{\text{des}}$ ) während des Einwasches (Mittelwerte + SEM); n.s. gepaarter t-test.

### 3.4.15 Secbutabarbital: Konzentrationssprünge

Die Konzentrationssprünge wurden mit 1000  $\mu\text{M}$  Secbutabarbital durchgeführt (Abb. 93).

#### 3.4.15.1 Konzentrationssprünge: 1000 $\mu\text{M}$ Secbutabarbital

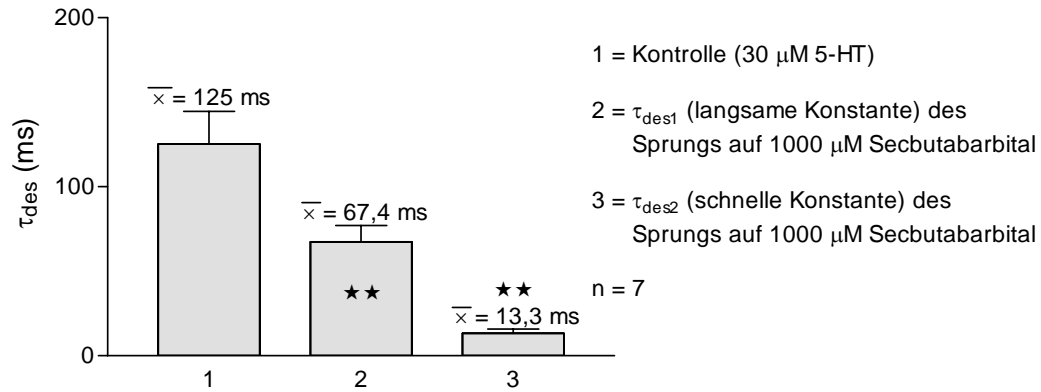


Abbildung 93: Desensibilisierungszeitkonstanten während der Konzentrationssprünge auf 1000  $\mu\text{M}$  Secbutabarbital (Mittelwerte + SEM); \*\*  $p \leq 0,01$ , gepaarter t-test, basierend auf Absolutwerten.

Die Konzentrationssprünge auf 1000  $\mu\text{M}$  Secbutabarbital ließen sich durch biexponentielle Funktionen am besten beschreiben. Sie waren durch eine schnelle und eine langsame Zeitkonstante (Abb. 94) charakterisiert. Der Vergleich ihrer jeweiligen Amplituden zeigte, dass die langsame Zeitkonstante 66% und die schnelle Zeitkonstante 34 % des Gesamteffektes ausmachte.

Beispielstromspuren:

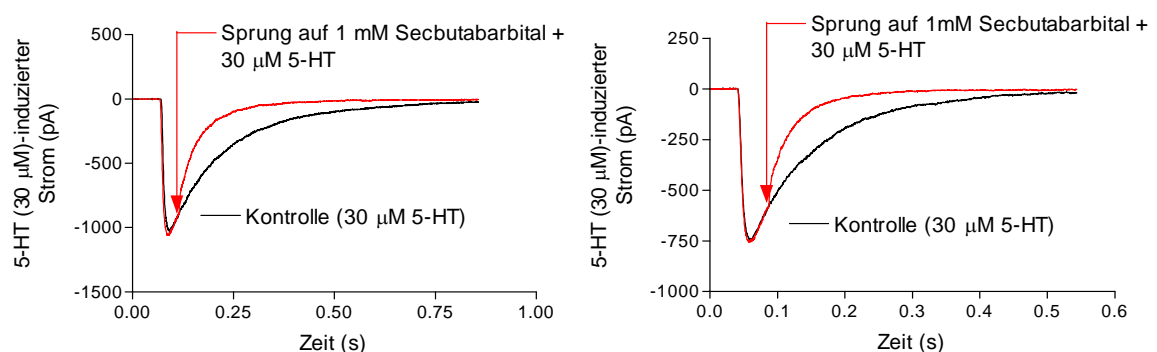


Abbildung 94: Konzentrationssprungexperimente mit 1000  $\mu\text{M}$  Secbutabarbital. Schwarz: Kontrolle (30  $\mu\text{M}$  5-HT); rot: 1000  $\mu\text{M}$  Secbutabarbital + 30  $\mu\text{M}$  5-HT.

## 4. Diskussion

Der 5-HT<sub>3</sub> Rezeptor ist der einzige 5-HT Rezeptor, der zu der Familie der Ligand gesteuerten Ionenkanäle gehört (Derkach et al. 1989; Kilpatrick et al. 1990; Costall 1997)). Dieser Rezeptor ist an der Modulation von Substanz-induzierter Emesis bzw. postoperativer Emesis beteiligt. Somit ist es wichtig die Rolle des 5-HT<sub>3</sub> Rezeptors bei der Emesis weiter zu untersuchen, um den Mechanismus der „Postoperative Nausea and Emesis“ (PONV) identifizieren zu können. In vorherigen Studien an 5-HT<sub>3</sub> Rezeptoren in N1E-115 Zellen konnte gezeigt werden, dass Pentobarbital, ein intravenöses Anästhetikum, ebenso wie Propofol einen inhibitorischen Effekt an diesem Rezeptor aufweist (Barann et al. 1997; Barann et al. 2000a). Diese Ergebnisse sollten nun mit Untersuchungen an humanen 5-HT<sub>3</sub> Rezeptoren verglichen werden. Weiterhin war es wichtig, zu prüfen, ob strukturähnliche Substanzen gleiche Effekte hervorrufen. Daher wurde in dieser Arbeit der Effekt verschiedener Phenol- und Barbituratderivate am humanen 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor untersucht, um Rückschlüsse auf die molekularen Wirkmechanismen dieser Präparate ziehen zu können. Die Messung ihrer Kinetiken (Zeitverläufe) sollte dazu beitragen, unterschiedliche Effekte zu differenzieren.

### 4.1 Validität der Daten

Die Validität der Daten wurde überprüft, indem verschiedene experimentelle Varianten durchgeführt und verglichen wurden, wie z. B.

- (1) der Nachweis und Vergleich der Lösungsaustauschraten an Offenpipettenexperimenten und an „Patchen“ mit humanen 5-HT<sub>3</sub> Kanälen.
- (2) Die Bestimmung der besten Einstellungen des schnellen Lösungsaustauschsystems, wie die Geschwindigkeit des Motors des Rotationskopfes.
- (3) Die Veränderung der Flußrate. Beispielsweise wurde der ++ Einwasch mit 14 µM Propofol bei zwei verschiedenen Flußraten durchgeführt. Obwohl diese sich um den Faktor drei unterschieden, zeigte sich kein Einfluß auf die Kinetiken oder die Inhibierung des durch Propofol ausgelösten Effektes.

## 4.2 Bestimmung der Propofol- und Isopropylphenolkonzentrationen

Die Bestimmung der jeweiligen Propofol- und Isopropylphenolkonzentrationen mittels HPLC war notwendig, um zu überprüfen, ob es mit dem „Solution exchange system“ möglich war, konstante und reproduzierbare Konzentrationen der Substanzen auf den „Patch“ zu applizieren (Barann et al. 1997; Barann et al. 2000b). Obwohl das „Solution exchange system“ hauptsächlich aus Teflon und Glas bestand, kam es bei Propofol zu einem Konzentrationsverlust zwischen 16-45 % sowie bei Isopropylphenol zwischen 14-30 %. Dieser Konzentrationsverlust liegt in Bereichen, die auch in früheren Studien bestimmt wurden. Für einen Konzentrationsverlust von Propofol wurden 10-23 % bei Barann et al. (Barann et al. 2000b) angegeben.

## 4.3 Wirkungen der Phenolderivate am 5-HT<sub>3A</sub> Rezeptor

### 4.3.1 Allgemein mögliche Auswirkung von Anästhetika auf 5-HT<sub>3A</sub> Rezeptoren

Unterschiedliche Substanzen können zu ganz verschiedenen Effekten an Rezeptoren führen, die wiederum die Rezeptorvermittelten Effekte unterschiedlich beeinflussen können.

Unterschieden werden zwei unterschiedliche Grundeffekte:

- a) Inhibierung
- b) Potenzierung

Beide Effekte können über Einflüsse auf den Peakstrom, aber auch über Veränderungen der Aktivierung oder Deaktivierung des Rezeptors vermittelt werden. Das bedeutet, dass eine Inhibierung bei gleichem Peakstrom auch durch eine Verlangsamung der Aktivierung oder eine Beschleunigung der Desensibilisierung des Stroms erreicht werden kann, wohingegen eine Beschleunigung der Aktivierung oder Verlangsamung der Desensibilisierung zu einer Potenzierung des Effektes führen kann. Es ist folglich sehr wichtig, den Einfluss eines Präparates auf alle Charakteristika einer Stromkurve zu überprüfen, damit alle Effekte charakterisiert werden können. Denn eine effektive Inhibierung des 5-HT<sub>3</sub> Rezeptors vermindert auch das Risiko des Auftretens von Übelkeit, und eine Potenzierung des Rezeptors unterstützt das Auftreten dieser ungewünschten Nebenwirkung. Allerdings erklären diese Phänomene nicht den jeweiligen Mechanismus über den die Inhibierung oder Potenzierung der Rezeptoraktivität vermittelt wird. Mögliche Inhibierungsmechanismen stellen z.B. die Blockierung der Pore oder eine

Kompetition mit dem Agonisten dar (Franks and Lieb 1984). Bisher konnten diese Mechanismen jedoch noch nicht unterschieden werden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Substanzen, die den 5-HT<sub>3A</sub> Rezeptor bei klinischen Konzentrationen inhibieren, antiemetisch wirksam waren, bzw. im Vergleich zu ähnlichen Substanzen eine geringere Emetogenität zeigten. Substanzen, die den Rezeptor potenzierten oder keine Inhibierung zeigten, gehörten zu Stoffgruppen, die eher emetogen wirksam waren (Barann 2006). Im Folgenden wird daher detailliert auf die Ergebnisse und ihre möglichen Wirkmechanismen eingegangen.

#### **4.3.2 Konzentrations-Wirkungskurven der Phenolderivate**

Die -+ und +- Konzentrations-Wirkungskurve (siehe Methodik) von Propofol ließen sich gut mit einer monophasischen, sigmoidalen Dosis-Wirkungsbeziehung darstellen. Der jeweilige IC<sub>50</sub>-Wert lag bei ca. 30 µM Propofol. Bei der ++ Konzentrations-Wirkungskurve jedoch konnte eindeutig festgestellt werden, dass die Konzentrationswirkungsbeziehung nicht auf einer monoexponentiellen Funktion beruht. Um einen biexponentiellen Fit jedoch so zu verifizieren, dass beide IC<sub>50</sub>-Werte bestimmt werden können, lagen nicht genügend Datenpunkte vor. Denn der biexponentielle Fit konnte auf zwei Arten durchgeführt werden, bei denen jeweils der zweite IC<sub>50</sub>-Werte sehr stark variierte, was auch die 95% Konfidenzintervalle widerspiegeln.

Bei der ersten biexponentiellen Funktion wurden die IC<sub>50</sub>-Werte mit 25 µM und 4 µM bestimmt (Abb. 89), wobei die Konfidenzintervalle nicht genau bestimmt werden konnten.



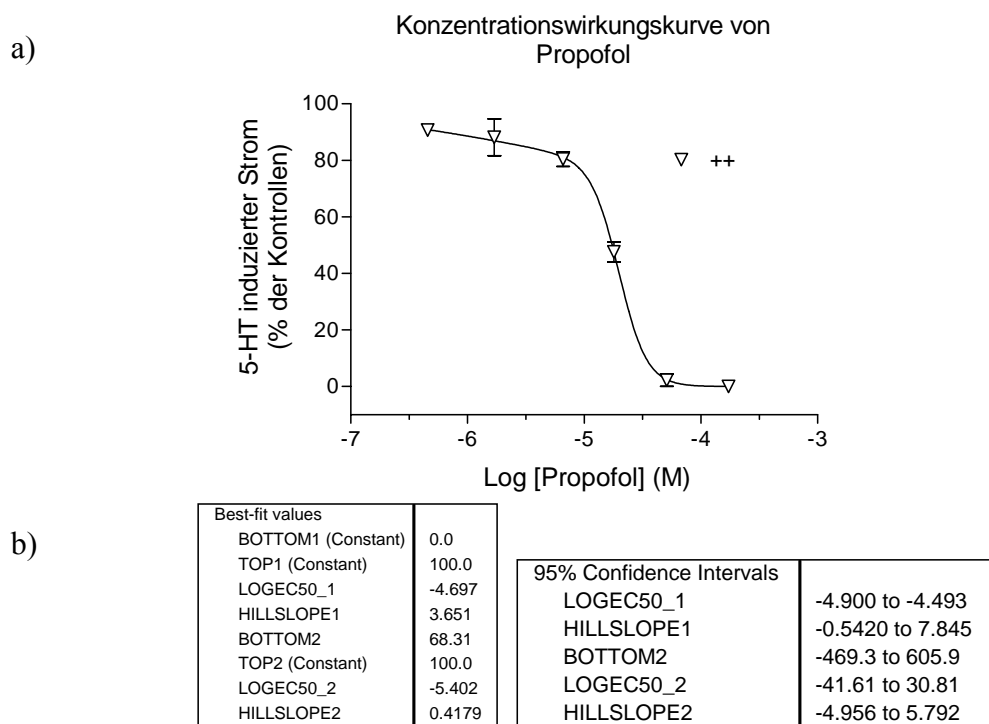


Abbildung 89: a) ++ Konzentrations-Wirkungskurve Propofol; b) Fitparameter

Bei der zweiten biexponentiellen Funktion wurden die  $IC_{50}$ -Werte mit ebenfalls 25  $\mu$ M und 800  $\mu$ M bestimmt (Abb. 90), wobei die Konfidenzintervalle ebenfalls nur sehr ungenau bestimmt werden konnten.

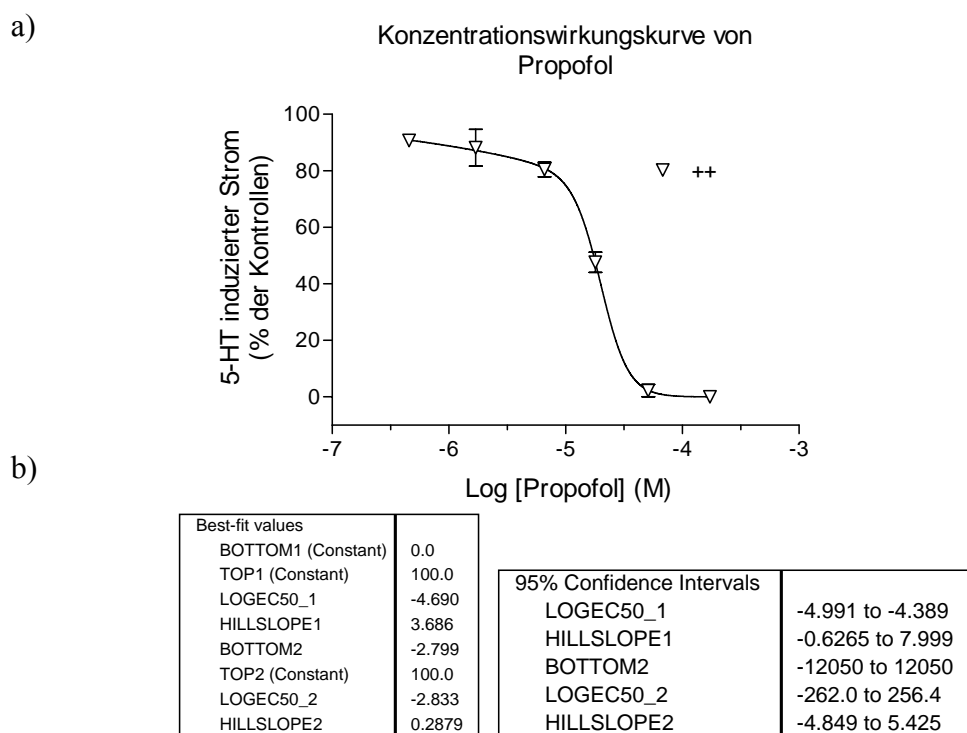


Abbildung 90: a) ++ Konzentrations-Wirkungskurve Propofol; b) Fitparameter

Bei beiden Funktionen wurde der erste  $IC_{50}$ -Wert auf ca. 25  $\mu M$  bestimmt. Dieser Wert kann folglich als sicher bestimmt eingestuft werden. Der zweite  $IC_{50}$ -Wert liegt zwischen 4 und 800  $\mu M$ . Bei beiden Werten waren die Konfidenzintervalle sehr ungenau. Folglich wäre es notwendig weitere Meßpunkte zu erstellen, um diesen Wert korrekt bestimmen zu können. Es wurde allerdings deutlich, dass bei schon niedrigen Propofolkonzentrationen zwischen 1-10  $\mu M$  ein signifikanter Effekt einsetzt (siehe 3.3.2), welcher auch in anderen Studien an 5-HT<sub>3</sub> Rezeptoren (Barann et al. 2000a) und GABA Rezeptoren (Patten et al. 2001) beobachtet werden konnte. Diese Konzentration liegt im Bereich der Konzentration von 2  $\mu M$  Propofol, bei der 50 % der Patienten keine motorische Reaktionen auf tracheale Intubation zeigen (Kazama et al. 1998).

Der biphasische Verlauf der ++ Konzentrations-Wirkungskurve deutet darauf hin, dass Propofol verschiedene Effekte am 5-HT<sub>3</sub> Rezeptor auslöst. Der Vergleich der ++ mit der - + Applikation von Propofol zeigte, dass die Vorapplikation notwendig war, um eine größtmögliche Inhibierung zu erlangen. Beim Vergleich der ++ mit der +- Applikation wurde deutlich, dass der kurze Auswasch nach einer langen Propofoleinwaschzeit nicht ausreichend ist, um eine direkte Erholung von der Peakstrominhibierung zu erreichen. Dies lässt vermuten, dass die Kinetik des Inhibierungseffektes durch Propofol eine langsame Kinetik besitzt.

Propofol führte bei keiner der gemessenen Konzentrationen zu einer Aktivierung des Rezeptors und zeigte auch keine agonistischen Eigenschaften am 5-HT<sub>3</sub> Rezeptor wie es in anderen Studien am GABA<sub>A</sub> Rezeptor beschrieben wurde (Orser et al. 1994; Jenkins et al. 1996; Lam and Reynolds 1998; Pistis et al. 1999; Davies et al. 2001; Krasowski et al. 2001; Dong and Xu 2002; Brown et al. 2002; Feng and Macdonald 2004).

Eine Eigenaktivierung des 5-HT<sub>3A</sub> Rezeptors durch Isopropylphenol oder Phenol konnte ebenfalls bei keiner der gemessenen Konzentrationen, d.h. für Isopropylphenol zwischen 1-100  $\mu M$  und für Phenol bei 1 + 3 mM, festgestellt werden. Für höhere Konzentrationen bleibt dies noch zu überprüfen.

Die Konzentrations-Wirkungskurven für Isopropylphenol konnten bei allen drei Applikationsarten durch monophasische Funktionen gut beschrieben werden. Es zeigte sich deutlich, dass bei Isopropylphenol wie auch bei Phenol und Propofol bei der -+ (Offenkanal-) applikation ein Effekt auftritt, der bei der +- und ++ Applikation entweder verdeckt oder antagonisiert zu sein scheint. Bei Isopropylphenol und Phenol kam es bei dieser Applikation zu einer Potenzierung des 5-HT Effektes, wie es auch für Propofol am GABA<sub>A</sub> Rezeptor beschrieben wurde (Schwieler et al. 2003).

Bei der ++ und +- Applikation hingegen kam es zu einer Inhibierung des durch 5-HT induzierten Stroms mit einem  $IC_{50}$ -Wert für Isopropylphenol von 17, 2  $\mu M$  bzw. 13, 9  $\mu M$ . Diese Werte liegen sehr dicht an den  $IC_{50}$ -Werten für Propofol. Für Phenol konnten keine genauen  $IC_{50}$ -Werte bestimmt werden, da zu wenige Meßpunkte vorhanden waren. Dennoch konnte gezeigt werden, dass auch bei Phenol der Effekt der Potenzierung bei der Offenkanalapplikation im Gegensatz zu den anderen Applikationsarten vorhanden war. Der  $IC_{50}$ -Wert für die Inhibierung scheint sowohl bei der ++, als auch bei der +- Applikation bei ca. 1000  $\mu M$ , also weitaus höher als bei den beiden anderen Phenolderivaten zu liegen. Eine Erklärung hierfür könnte die unterschiedliche Lipophilie der Präparate sein. Propofol hat einen LogP-Wert von 3, 79, Isopropylphenol von 2,88 und Phenol besitzt die niedrigste Lipophilie mit einem LogP-Wert von 1,46. In wieweit die unterschiedliche Lipophilie jedoch eine Rolle spielt, bleibt weiter zu untersuchen. Strukturell unterscheidet die Phenolderivate, dass die Hydroxylgruppe, die sie alle besitzen, nur bei Propofol durch zwei Isopropylgruppen sterisch abgeschirmt zu sein scheint. Bei Isopropylphenol und beim Phenol wird der Zugang und damit die Bindungsfähigkeit dieser Gruppe durch das Fehlen einer bzw. beider Isopropylgruppen stark erhöht. Das Ausbilden von Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Rezeptor könnte folglich die Ursache des potenzierenden Effektes bei Isopropylphenol und Phenol sein.

### 4.3.3 Einfluß auf Aktivierung und Desensibilisierung

Die Aktivierungszeitkonstanten wurden durch Propofol bei den gemessenen Konzentrationen nicht verändert (Abb. 28 a). Auch bei mACh Rezeptoren zeigte Propofol keinen Einfluss auf die Aktivierung der Rezeptoren (Nagase et al. 1999; Murasaki et al. 2003). Bei Isopropylphenol und Phenol kam es bei der +- Applikation ebenfalls nicht zu einer Veränderung (Abb. 48 a, 58 a). Bei der ++ und +- Applikation allerdings wurden diese Zeitkonstanten konzentrationsabhängig langsamer (Abb. 48 a, 58 a).

Die Auswertung des Propofoleffektes auf die Desensibilisierungskinetik zeigte, dass bei der +- Applikation allenfalls eine geringe, aber keinesfalls konzentrationsabhängige Beschleunigung der Desensibilisierungszeitkonstante beobachtet werden konnte. Bei der - + Applikation kam es jedoch zu einer konzentrationsabhängigen Beschleunigung dieser Zeitkonstanten, im gleichen Ausmaß wie bei der ++ Applikation (Abb. 28 b). Dies lässt darauf schließen, dass bei der +- und +- Applikation unterschiedliche Effekte zum Tragen kommen und dass die +- oder Offenkanalapplikation einen größeren Einfluß auf die Beschleunigung der Desensibilisierungszeitkonstanten hat. Hier zeigt sich eine weitere

Parallele zu den Phenol- und Isopropylphenoleffekten. Denn auch hier wurden die Desensibilisierungszeitkonstanten im +- Modus nicht beeinflusst, im ++ und -+ Applikationsmodus kam es jedoch zu einer konzentrationsabhängigen Verlangsamung dieser Zeitkonstanten, die bei Isopropylphenol im -+ Modus am stärksten zur Ausprägung kam. Es scheint bei allen drei Phenolderivaten so zu sein, dass die Offenkanalapplikation vor allem in Bezug auf die Desensibilisierung schon einen Effekt hervorruft. Bei Propofol führt dieser Effekt zu einer deutlichen Beschleunigung der Desensibilisierung, bei Isopropylphenol und Phenol allerdings zu einer starken Verlangsamung. Eine mögliche Erklärung wäre, dass sich innerhalb der Pore eine Bindungsstelle befindet, die die Desensibilisierung moduliert und an die alle drei Präparate binden können. Wäre der Phenolring für eine Verlangsamung verantwortlich, könnte die bei Propofol noch vorhandenen Isopropylgruppen dazu führen, dass die Bindung nicht komplett stattfinden kann und es statt zu einer Verlangsamung zu einer Beschleunigung der Desensibilisierung kommt. Dies könnte bedeuten, dass die 5-HT<sub>3</sub> Rezeptoren ihrer physiologischen Funktion in geringerem Maße nachkommen, die Substanz folglich eher antiemetisch wirkt.

#### 4.3.4 Kinetiken der durch die Phenolderivate induzierten Effekte

Um einen ersten Eindruck über die Effekte der Phenolderivate am 5-HT<sub>3A</sub> Rezeptor zu erlangen, wurden die Ein- und Auswaschzeitkonstanten der Propofol- und Isopropylphenoleffekte bei einer Konzentration, die ca. zum halbmaximalen Effekt führte, bestimmt (Tabelle 1). Gemessen wurde der ++ Applikationsmodus.

Präparat [ $\mu$ M]	$\tau_{\text{einschnell}}$ (ms)	$\tau_{\text{einlangsam}}$ (s)	$\tau_{\text{auschnell}}$ (ms)	$\tau_{\text{auslangsam}}$ (s)
Propofol [14]	50,9	5,3	28,8	1,5
Isopropylphenol [21]	56,9	6,6	6,4	4,2

Tabelle 1: Charakteristika der ++ Einwaschkinetiken und Auswaschkinetiken.

Bei beiden Präparaten war sowohl der Einwasch, als auch der Auswasch durch zwei Zeitkonstanten charakterisiert. Beim Einwasch waren sie sich sehr ähnlich, sodaß man vermuten kann, dass bei Propofol und Isopropylphenol der gleiche Effekt stattgefunden hat. Dies legt nahe, dass auch beim Auswasch der gleiche Effekt zum Tragen kommt. Dies kann allerdings durch diese Messung nicht belegt werden, da die Zeitkonstanten sich zwar

jeweils im Millisekunden- und Sekundenbereich befinden, die Absolutwerte allerdings voneinander abweichen.

Um die Kinetik der Propofolinhibierung und die Abhängigkeit der Inhibierung von der Vorapplikation des Propofols charakterisieren zu können, wurden die Einwasch und Auswaschexperimente bei verschiedenen Propofolkonzentrationen und im +- Modus durchgeführt (Abb. 30 - 33).

Konzentration [ $\mu\text{M}$ ]	$\tau_{\text{ein}}^{\text{schnell}}$ (ms)	$\tau_{\text{ein}}^{\text{langsam}}$ (s)	$\tau_{\text{aus}}^{\text{schnell}}$ (ms)	$\tau_{\text{aus}}^{\text{langsam}}$ (s)	Maximal- inhibierung(%)
5	26,0	4,3	99,0	22,2	20
14	42,0	6,0	42,9	1,7	40
29	33,2	5,6	28,4	2,6	60
51	28,4	2,8	33,0	1,3	80

Tabelle 2: Charakteristika der +- Einwaschkinetiken sowie des Auswasches.

Bei allen +- Einwaschexperimenten kam es zu einer leichten, aber weder konzentrations-, noch vorapplikationsabhängigen Beschleunigung der Desensibilisierung der Ströme. Die Desensibilisierungszeitkonstante im ++ Einwasch von 14  $\mu\text{M}$  Propofol wurde abhängig von der Vorapplikationszeit beschleunigt. Nach 100 ms war das Maximum der Beschleunigung erreicht und konnte nicht mehr verstärkt werden.

Bei allen Konzentrationen konnten die +- Einwasch- und die jeweiligen Auswaschkinetiken mit zwei Zeitkonstanten charakterisiert werden (Tabelle 1), wobei die erste im Millisekunden- und die zweite im Sekundenbereich lag. Es konnte jedoch weder beim Einwasch, noch beim Auswasch eine Konzentrationsabhängigkeit nachgewiesen werden. Die Maximalinhibierung war allerdings klar konzentrationsabhängig. Die zwei Zeitkonstanten machen deutlich, dass Propofol schon beim +- Einwasch zu zwei Prozessen am Rezeptor führt.

Eine mögliche Erklärung der zwei Zeitkonstanten wäre, dass die Propofolwirkung über zwei unterschiedliche Kompartimente vermittelt werden könnte. Durch die hohe Lipophilie des Propofols ( $\log P = 3,79$ ) wäre es möglich, dass Propofol bei Vorapplikation direkt in die Membran diffundiert. So könnten diese Moleküle innerhalb von Millisekunden nach Öffnen der Kanäle an die Bindungsstelle gelangen und eine Inhibierung des Stroms

hervorrufen. Außerdem könnten sie durch die Membran weiter ins Zytoplasma diffundieren und von dort auch zur Bindungsstelle gelangen und so zur Inhibierung führen. Diese Möglichkeit sollte durch weitere Einwasch und Auswaschexperimente weiter überprüft werden. Deshalb wurde Propofol für unterschiedliche Zeiten (10s /60 s/ 300 s) eingewaschen (Abb. 34) und es folgten die Auswaschexperimente mit den unterschiedlichen Auswaschzeiten (Tabelle 2).

Propofoleinwasch (s)	$\tau_{\text{aus schnell}}$ (ms)	$\tau_{\text{aus langsam}}$ (s)
10	25,8	6,8
60	42,9	1,7
300	162,0	2,5

Tabelle 3: Charakteristik des Propofol auswasches nach verschiedenen Einwaschzeiten

Unabhängig von der Propofoleinwaschzeit waren die auch bei diesen Experimenten die Auswaschkinetiken jeweils durch zwei Zeitkonstanten, eine im Millisekunden-, die andere im Sekundenbereich, charakterisiert. Die schnelle Zeitkonstante wurde mit zunehmender Vorapplikationszeit langsamer, d.h. der durch Propofol vermittelte schnelle Effekt wurde nach längerer Einwaschzeit langsamer wieder ausgewaschen. Bei der langsamen Zeitkonstanten konnte keine Abhängigkeit von der Einwaschzeit nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass dieser langsame, durch Propofol vermittelte Effekt nicht auf einer Konzentrationserhöhung von Propofol im Zytoplasma verursacht worden sein kann.

#### 4.3.5 Kompetitivität

Ein kompetitiver Antagonist ist in der Lage, sich an der gleichen Bindungsstelle des Rezeptors wie der Agonist anzulagern. Ein solcher Antagonist besitzt jedoch keine intrinsische Aktivität, d.h. er kann keinen Effekt auslösen. Da Agonist und kompetitiver Antagonist um denselben Rezeptor konkurrieren, kann durch die Erhöhung der Konzentration des einen Stoffes der andere vom Rezeptor verdrängt werden. Eine kompetitive Inhibierung würde für eine Substanz eher einen antiemetischen Effekt bedeuten, da sie bei entsprechender Potenz schon vor der Ausschüttung des Agonisten (5-HT) die Aktivierung des Rezeptors „präventiv“ verhindert.

Dies war bei Propofol eindeutig der Fall. Durch die Erhöhung der Serotoninkonzentration wurde die durch Propofol induzierte Inhibierung antagonisiert (siehe Seite 55).

Auch der durch Isopropylphenol im -+ Applikationsmodus induzierte potenzierende Effekt konnte durch die Erhöhung der Serotoninkonzentration antagonisiert werden (Abb. 60). Bei der Auswertung der Integrale konnte dieser Effekt jedoch nicht deutlich bestätigt werden. Folglich scheint es sich bei Propofol um einen kompetitiven Antagonisten zu handeln, wohingegen dies beim Isopropylphenol noch weiter überprüft werden muß. Diese Beobachtung steht jedoch im Gegensatz zu früheren Studien, wie z. B. Radioligand-bindungsstudien von (Appadu and Lambert 1996; Schwieler et al. 2003), die zeigten, dass Propofol den kompetitiven Antagonisten [ $^3\text{H}$ ]-GR65630 nicht effektiv von der 5-HT Bindungsstelle verdrängen konnte. (Barann et al. 1993; Schwieler et al. 2003) zeigten 1993 ebenfalls in Tracerfluxstudien, dass Propofol den 5-HT induzierten Guanidiniumflux in N1E Zellen nicht kompetitiv hemmte. Diese Ergebnisse müssen sich jedoch nicht widersprechen, es besteht vielmehr die Möglichkeit, dass diese Diskrepanz auf die unterschiedlichen Applikationsmodi, mit denen diese Experimente durchgeführt wurden, zurückzuführen ist. So wurden die Radioligand- bzw. Tracerfluxstudien in der ++ Applikation durchgeführt, die in dieser Arbeit durchgeführten Kompetitivitätsexperimente jedoch in der -+ Applikation. Es könnte folglich möglich sein, dass der durch die Phenolderivate ausgelöste schnelle Effekt, der in der -+ Applikation deutlich wird, in der ++ Applikation von dem zweiten Effekt, durch diese Präparate ausgelösten Effekt, überlagert wurde. Dies könnte auch darauf hin deuten, dass es am 5-HT<sub>3</sub> Rezeptor noch eine zweite Bindungsstelle für die Phenolderivate, insbesondere fürs Propofol, geben könnte. Dadurch könnten die Phenolderivate den zweiten Effekt nicht kompetitiv vermitteln, wodurch bei Versuchen in der ++ Applikation, bei denen der zweite Effekt den ersten überlagert, keine Kompetitivität mehr festgestellt werden kann. Das gemeinsame strukturelle Merkmal eines hydroxylierten Aromaten des Neurotransmitters Serotonin und der Phenolderivate könnte bedeuten, dass die Präparate an der gleichen Bindungsstelle angreifen und tatsächlich ein kompetitiver Mechanismus vorliegt.

#### **4.3.6 Molekulare Wirkung der Phenolderivate**

Bei allen beschriebenen Effekten der Phenolderivate handelt es sich immer um spezifische Effekte am 5-HT<sub>3A</sub> Rezeptor, da alle reversibel waren.

Alle Phenolderivate greifen in den Prozess der Desensibilisierung ein. Propofol führt zu einer starken Beschleunigung und Isopropylphenol und Phenol zu einer starken

Verlangsamung der Desensibilisierung. In anderen Studien an GABA<sub>A</sub> Rezeptoren wurde für  $\alpha 1\beta 3\gamma 2L$  und  $\alpha 6\beta 3\gamma 2L$  Rezeptoren ebenfalls eine Verlangsamung der Desensibilisierung durch Propofol festgestellt (Bai et al. 1999; Dong and Xu 2002; Schwieler et al. 2003; Feng and Macdonald 2004). Doch egal, ob dieser Effekt nun zur Potenzierung oder Inhibierung der Desensibilisierung führte, er war nach der ++ und +- Applikation jeweils am stärksten ausgeprägt. Nach der +- Applikation konnte der Effekt gar nicht bzw. nur minimal nachgewiesen werden. Dies könnte darin begründet sein, dass es nach der +- Applikation bis zum „Peakstrom“ schon zu einem Auswasch von ca. 20 ms kommt, so dass daher schon wieder ein Teil des Effektes ausgewaschen worden sein könnte. In früheren Studien an Maus-5-HT<sub>3</sub> Rezeptoren in N1E Zellen (Barann et al. 1998) wurde gezeigt, dass nach Vorapplikation von Propofol die Ströme mit der gleichen Geschwindigkeit desensibilisieren, wie nur mit 5-HT induzierte Ströme, woraus man folgern konnte, dass Propofol die Desensibilisierung der 5-HT Rezeptoren wie 5-HT triggern/induzieren könnte (Barann et al. 2000c). Dies konnte bei den humanen 5-HT<sub>3A</sub> Rezeptoren nicht nachgewiesen werden. Eindeutig ist jedoch, dass die Phenolderivate auch bei humanen 5-HT<sub>3A</sub> Rezeptoren in den Prozess der Desensibilisierung eingreifen.

Weiterhin stellt sich die Frage, welche molekulare Struktur für die Wirkung der Phenolderivate am 5-HT<sub>3A</sub> Rezeptor verantwortlich ist. Es liegt nahe, dass die Wirkung dieser Derivate über den bei allen vorhandenen Phenolring und die Hydroxylgruppe vermittelt wird.

Den Phenolring findet man auch bei vielen Neurotransmittern wieder, so auch beim direkten Agonisten des 5-HT<sub>3A</sub> Rezeptors, dem Serotonin. Das Serotonin führt zum Öffnen der 5-HT<sub>3A</sub> Rezeptoren und damit zur Signalweiterleitung, was ein Faktor für die Entstehung von Emesis ist. Da bekannt ist, dass Antagonisten des Serotonins den Effekt der Übelkeit und des Erbrechens mit Erfolg reduzieren (Tramer et al. 1997b), werden 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorantagonisten als effektive Pharmaka zur Kontrolle dieser Faktoren eingesetzt (Tyers et al. 1989). Propofol führt schon bei klinischen Konzentrationen zur Inhibierung der 5-HT<sub>3A</sub> Rezeptoren, wodurch die Signaltransduktion verringert wird. Auch Emesis kommt nach Propofolgabe höchst selten vor (Akin et al. 2006). Phenol und Isopropylphenol führen jedoch dazu, dass es zumindest nach der +- Applikation zu einer Potenzierung der 5-HT Wirkung kam. Diese beiden Präparate unterscheiden sich vom Propofol durch das Fehlen einer (beim Isopropylphenol) bzw. zwei Isopropylgruppen (Phenol). Dadurch liegt die Hydroxylgruppe jeweils freier als beim Propofol. Es wäre folglich möglich, dass es neben einer Bindung des Phenolrings am Rezeptor zusätzlich zu



einer Wasserstoffbrückenbildung zwischen der freien Hydroxylgruppe und dem Rezeptor kommt, die dazu führt, dass eine Potenzierung des Effektes bewirkt wird. Ob eine solche Bindung innerhalb der Pore stattfindet, das Molekül das Schließen der Pore verhindert und so eine Potenzierung verursacht oder ob der Desensibilisierungsvorgang verhindert wird, muß weiter untersucht werden. Eine Potenzierung des 5-HT Effektes könnte allerdings auch dazu führen, dass die Nebenwirkungen von Übelkeit und Erbrechen verstärkt würden. Dies gilt selbstverständlich zu vermeiden. Somit sollte auch verhindert werden, dass Anästhetika freie, bindungsfähige Hydroxylgruppen besitzen.

Aufgehoben wird diese Potenzierung auch durch die Vorapplikation (bei ++ und +- Applikation) der Präparate, und ähnlich dem Propofol in eine Inhibierung verwandelt. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass der Offenkanalapplikation eine besondere Stellung zugesprochen werden muß und dass bei dieser Applikationsart den Präparaten entweder eine weitere Bindungsstelle zugänglich wird, bzw. aber die Präparate zu einer Konfigurationsänderung führen können, die einen anderen Effekt als die anderen Applikationsarten zeigt.

Allerdings stellt sich hier die Frage in wie weit die -+ Applikation eine physiologische Situation darstellt. Denn es ist weitaus unwahrscheinlich, dass es an einer Synapse zu einer Koapplikation des jeweiligen Präparates mit aus den Vesikeln ausgeschütteten Serotonins kommen wird, ohne dass die Substanz vorher präsent war. Die ++ Applikation oder auch die +- Applikation sind folglich die wahrscheinlich realistischsten Situationen an der Synapse. Bei der +- Applikation bleibt jedoch die Problematik bestehen, dass der Effekt der „reinen“ Vorapplikation schwer zu bestimmen ist, da es mit der Serotoninapplikation gleichzeitig zu einem Auswasch des Effektes kommt und somit ein sehr schneller Effekt leicht übersehen werden kann.

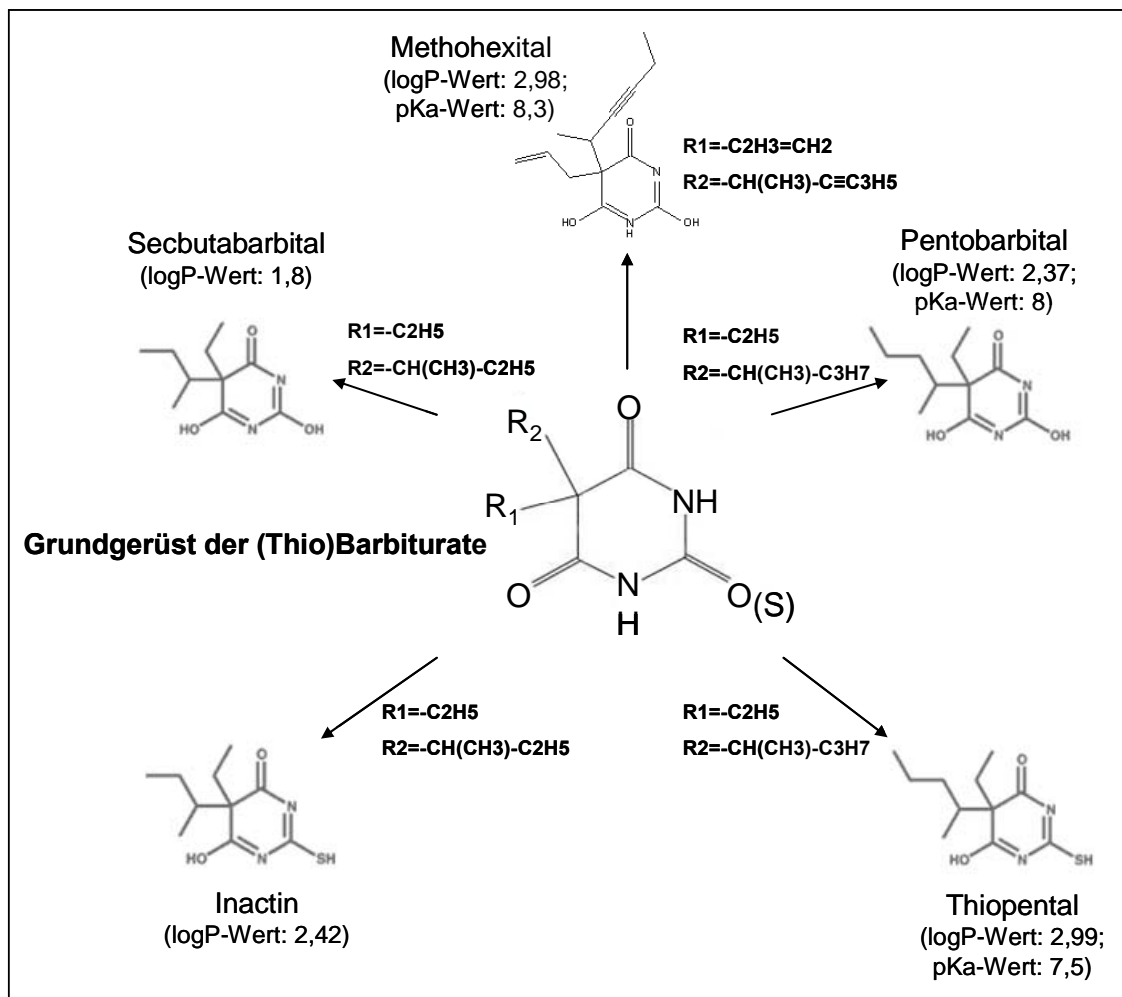
## 4.4 Wirkungen der Barbituratderivate am 5-HT<sub>3A</sub> Rezeptor

### 4.3.1 Auswahl der Barbituratderivate

Die Auswahl der Barbiturate, die untersucht wurden, wurde nach folgenden Kriterien getroffen:

1. Die Barbiturate sollten in der Klinik eingesetzt werden.
2. Die ausgewählten Derivate sollten sich nur durch 1 Methylgruppe unterscheiden.

In folgender Abbildung sind alle in dieser Arbeit untersuchten Barbiturate dargestellt:



### 4.3.2 Konzentrations-Wirkungskurven der Barbituratderivate

Alle Barbituratderivate führten zu einer konzentrationsabhängigen Inhibierung des 5-HT<sub>3A</sub> Rezeptors. Bei Methohexital, Thiopental und Pentobarbital konnten alle ++ Konzentrations-Wirkungskurven biphasisch beschrieben werden. Die Effekte von Inactin und Secbutabarbital, die sich jeweils nur durch das Fehlen einer Methylgruppe von Thiopental und Pentobarbital unterscheiden, zeigten in den Konzentrations-Wirkungskurven einen klar monophasischen Verlauf.

Dies deutet darauf hin, dass Methohexital, Thiopental und Pentobarbital zwei Effekte am 5-HT<sub>3A</sub> Rezeptor auslösen, die zwei anderen Barbituratderivate jedoch nur noch einen einzelnen Prozess auslösen.

	++	++	+-	+-	-+	-+
	IC <sub>50</sub> (1)	IC <sub>50</sub> (2)	IC <sub>50</sub> (1)	IC <sub>50</sub> (2)	IC <sub>50</sub> (1)	IC <sub>50</sub> (2)
Methohexital	26,5 µM	325 µM	27,5 µM	530 µM	11,8 µM	487 µM
Thiopental	17,4 µM	204 µM	16,3 µM	188 µM	58,0 µM	352 µM
Inactin	251 µM		740 µM		4727 µM	
Pentobarbital	11,2 µM	321 µM	51,3 µM	533 µM	110 µM	
Secbutabarbital	37,6 µM	1112 µM	6683 µM		1125 µM	

Tabelle 4: IC<sub>50</sub>-Werte der Barbiturateffekte.

Bisher erstellte Konzentrationswirkungskurven für diese Präparate, wurden alle monoexponentiell gefittet, deshalb lassen sich die IC<sub>50</sub>-Werte der Substanzen nicht mit Daten aus der Literatur vergleichen.

### 4.3.3 Kinetiken der Barbituratderivate

Um die einzelnen Effekte der Barbituratderivate weiter charakterisieren zu können, wurden die Einwasch- und Auswaschkinetiken im ++ Modus genau bestimmt. Methohexital, Thiopental und Pentobarbital zeigten wiederum sehr ähnliche Charakteristika, denn sowohl der Einwasch, als auch der Auswasch konnten durch zwei Zeitkonstanten, eine im Millisekunden-, die andere im Sekundenbereich, charakterisiert werden. Bei Secbutabarbital und Inactin hingegen war der Einwasch so schnell, d.h. schon nach einem Einwasch von 32 ms abgeschlossen, dass keine Zeitkonstante ermittelt werden konnte. Der

Auswasch dieser Präparate konnte nur mit einer Zeitkonstanten bestimmt werden (Tabelle 5).

Präparat	$\tau_{\text{ein1}}$	$\tau_{\text{ein2}}$	$\tau_{\text{aus1}}$	$\tau_{\text{aus2}}$
Methohexital	15,0 ms	1,3 s	34,9 ms	4,3 s
Thiopental	53,1 ms	3,4 s	57,0 ms	5,3 s
Inactin	nicht meßbar	nicht meßbar	17,7 ms	--
Pentobarbital	1,1 ms	1,3 s	13,6 ms	4,0 s
Secbutabarbital	nicht meßbar	nicht meßbar	--	4,6 s

Tabelle 5: Charakteristika des ++ Einwasches und Auswasches der Barbituratderivate.

Die Größe der Barbiturate scheint folglich einen erheblichen Einfluß auf ihre vermittelte Wirkung zu nehmen. Die Verkürzung der Moleküle um eine Methylgruppe beeinflusst stark die Geschwindigkeit des vermittelten Effektes, er wird sehr viel schneller. Die  $IC_{50}$ -Werte der Effekte sind jedoch sehr viel höher, bei Secbutabarbital sogar um den Faktor drei höher als bei Pentobarbital. Bei Inactin führt das Entfernen der Methylgruppe sogar dazu, dass der zweite Effekt, der durch Thiopental noch vermittelt wird, nicht mehr aufgelöst werden kann. Es stellt sich hier nun die Frage, ob dieser Effekt mit der unterschiedlichen Lipophilie der Präparate zusammenhängt. Der Vergleich der logP-Werte der Substanzen (Tab. 6) zeigt, dass einer Verringerung der Lipophilie zu einer Beschleunigung der Effekte führte bei stukturell ähnlichen Paaren führte. Gleichzeitig verringerte sich jedoch die Hemmpotenz.

	logP-Wert
Methohexital	2,98
Thiopental	2,99
Inactin	2,42
Pentobarbital	2,37
Secbutabarbital	1,8

Tabelle 6: LogP-Werte der Barbiturate.

#### 4.3.4 Einfluß auf Aktivierung und Desensibilisierung der Barbituratderivate

Die Aktivierungszeitkonstanten wurden von keinem der Barbituratderivate beeinflusst. Bei den Desensibilisierungszeitkonstanten kam es jedoch bei fast allen Substanzen zu einer starken Beschleunigung um 50 % im Vergleich zu den jeweiligen 30  $\mu\text{M}$  5-HT Kontrollen (Abb. 65, 72, 80, 87, 92).

Dies legt zum einen den Schluß nahe, dass Aktivierung und Desensibilisierung zwei voneinander unabhängige Prozesse sind, denn ansonsten hätte ein Einfluß auf beide Prozesse bestehen müssen.

Desweiteren lässt sich hier keine Korrelation zu den jeweiligen logP-Werten der Substanzen herstellen. Für diesen Effekt muß folglich eine Molekularstruktur verantwortlich sein, die bei allen Substanzen einheitlich vorhanden ist. Eine solche Struktur bzw. Molekül ist/sind die freien Säurereste der Barbitursäure, die für alle Barbiturate das Grundgerüst bildet.

#### 4.3.5 Konzentrationssprungeffekte der Barbituratderivate

Die Konzentrationssprungexperimente dienten dazu, schnelle Effekte, die innerhalb der ersten 32 ms Einwasch auftraten, zu bestimmen. Vorsichtig mit der Interpretation bzw. mit einem Vergleich mit den Einwaschexperimenten muß man hier jedoch sein, da bei diesen Experimenten die jeweilige Substanz auf schon vollständig geöffnete Kanäle appliziert wurde. Bei den Einwaschexperimenten wurde die Substanz jedoch auf die geschlossenen Kanäle oder mit dem Öffnen der Kanäle appliziert.

Es zeigte sich, dass bei 100  $\mu\text{M}$  Thiopental, 300  $\mu\text{M}$  Inactin, 300  $\mu\text{M}$  Pentobarbital und 1000  $\mu\text{M}$  Secbutabarbital die Konzentrationssprünge biexponentiell gefittet werden konnten, was darauf schließen lässt, dass diese Konzentrationen nach sehr kurzer Applikationszeit zu zwei verschiedenen Effekten führen können. Bei noch höheren Konzentrationen von Thiopental (300  $\mu\text{M}$ ) und Inactin (1000  $\mu\text{M}$ ) konnte nur noch eine Zeitkonstante festgestellt werden. Dies könnte bedeuten, dass der ganz schnelle Effekt, der bei den niedrigeren Konzentrationen bestimmt werden konnte bei höheren vollständig abgeschlossen und vom zweiten Effekt überlagert ist.

Um dies zu bestätigen, wäre es hier wichtig, diese Experimente mit weiteren Konzentrationen zu wiederholen, um so eine eventuelle Konzentrationswirkungsbeziehung bestimmen zu können.

Bei Methohexital konnte sowohl bei 100  $\mu\text{M}$ , als auch bei 300  $\mu\text{M}$  nur ein einzelner Effekt festgestellt werden. Hier weicht der Effekt von Methohexital von dem von Thiopental ab,

obwohl beide Substanzen ansonsten sehr ähnliche Wirkungen zeigten. Auch hier müssten noch weitere Experimente durchgeführt werden, um entscheiden, ob bei niedrigeren Konzentrationen von Methohexital ebenfalls noch ein zweiter Effekt festgestellt werden kann, oder ob sich die beiden Substanzen hier tatsächlich in ihrer Wirkung am 5-HT<sub>3</sub> Rezeptor unterscheiden.

## 5. Zusammenfassung

Unumstritten ist, dass der 5-HT<sub>3</sub> Rezeptor an der Vermittlung von Übelkeit und Erbrechen beteiligt ist, die molekularen Wirkmechanismen sind allerdings noch nicht vollständig erforscht. Bisherige elektrophysiologische Untersuchungen an humanen 5-HT<sub>3</sub> Rezeptoren haben bestätigt, dass eine Korrelation der antiemetischen Potenz von Pharmaka und der Hemmung des 5-HT<sub>3</sub> Rezeptors bei klinischen Konzentrationen besteht.

Mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik und eines schnellen Lösungsaustauschsystems sollte in dieser Arbeit der molekulare Wirkmechanismus verschiedener Anästhetika an 5-HT<sub>3A</sub> Rezeptoren, die stabil transfiziert in HEK 293 Zellen waren, untersucht werden. Über eine Strukturanalyse sollten anästhetisch wirksame Strukturen mit intrinsischer Hemmung von 5-HT<sub>3A</sub> Rezeptoren und somit antiemetischer Potenz charakterisiert werden.

Die Charakterisierung der Effekte der verschiedenen Phenolderivate Propofol, Isopropylphenol und Phenol führte zu der Hypothese, dass eine freie Hydroxylgruppe zu einer Potenzierung des Serotonineffektes führt. Da Propofol „nur“ eine durch zwei Isopropylgruppen sterisch „behinderte“ Hydroxylgruppe besitzt, kommt es nicht zum potenzierenden Effekt, sondern es dominiert ein inhibierender Effekt bei klinisch wirksamen Konzentrationen ( $IC_{50} = 4 \mu M$ ). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es sich bei Propofol um einen kompetitiven Antagonisten handelt, was auch mit dem in der Klinik beobachteten, antiemetischen Effekt von Propofol korreliert.

Die Effekte der Barbituratderivaten (Methohexital, Thiopental, Inactin, Pentobarbital und Secbutabarbital) waren von ihrer Molekülgröße bzw. ihrer Lipophilie abhängig. Die Verkleinerung der Moleküle um eine Methylgruppe, und damit auch die Verringerung ihrer Lipophilie, führten zu einer Beschleunigung der von ihnen vermittelten Effekte. Gleichzeitig verringerte sich die Hemmpotenz.

Dies bedeutet, dass bei einem zukünftig neu entwickelten Anästhetikum darauf geachtet werden sollte, dass wenn möglich

- (1) es sich um einen kompetitiven Antagonisten handelt, da ein solcher schon vor der Serotoninausschüttung eine Aktivierung des Rezeptors verhindert,
- (2) eine freie Hydroxylgruppe vermieden wird, damit es nicht zu einer unerwünschten Potenzierung des Serotonineffektes und damit zu verstärkten Nebenwirkungen kommt, und
- (3) die Lipophilie der Präparate ausreichend ist, somit eine hohe Potenz und eine Wirkung *vor* der Serotoninausschüttung gewährleistet ist.

Trotzdem bleibt zu klären, ob diese Eigenschaften mit einer hinreichenden anästhetischen Wirksamkeit vereinbar sind.



## 6. Literaturverzeichnis

Akin A, Esmaglu A, Gunes I, Boyaci A. The effects of the prophylactic tropisetron-propofol combination on postoperative nausea and vomiting in patients undergoing thyroidectomy under desflurane anesthesia. *Mt Sinai J Med* 2006;73:560-563.

Apfel CC, Laara E, Koivuranta M, Greim CA, Roewer N. A simplified risk score for predicting postoperative nausea and vomiting: conclusions from cross-validations between two centers. *Anesthesiology* 1999;91:693-700.

Appadu BL, Lambert DG. Interaction of i.v. anaesthetic agents with 5-HT<sub>3</sub> receptors. *Br J Anaesth* 1996;76:271-273.

Bai D, Pennefather PS, MacDonald JF, Orser BA. The general anesthetic propofol slows deactivation and desensitization of GABA(A) receptors. *J Neurosci* 1999;19:10635-10646.

Barann BBLLSWW. 5-HT<sub>3</sub> Receptors and Emesis. *Pharmacology reports* . 2006.  
Ref Type: In Press

Barann M, Bonisch H, Urban BW, Gothert M. Inhibition by propofol of 5-HT<sub>3</sub> receptors in excised patches of NIE-115 cells. *Ann N Y Acad Sci* 1998;861:278-9.:278-279.

Barann M, Dilger JP, Bonisch H, Gothert M, Dybek A, Urban BW. Inhibition of 5-HT<sub>3</sub> receptors by propofol: equilibrium and kinetic measurements. *Neuropharmacology* 2000a;39:1064-1074.

Barann M, Friederich P, Retzmann K, Dybek A, Urban BW. Loss of propofol during in vitro experiments. *Anesthesiology* 2000b;93:310-311.

Barann M, Gothert M, Bonisch H, Dybek A, Urban BW. 5-HT<sub>3</sub> receptors in outside-out patches of N1E-115 neuroblastoma cells: basic properties and effects of pentobarbital. *Neuropharmacology* 1997;36:655-664.

Barann M, Gothert M, Fink K, Bonisch H. Inhibition by anaesthetics of <sup>14</sup>C-guanidinium flux through the voltage-gated sodium channel and the cation channel of the 5-HT<sub>3</sub> receptor of N1E-115 neuroblastoma cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1993;347:125-132.

Barann M, Meder W, Dorner Z, Bruss M, Bonisch H, Gothert M, Urban BW. Recombinant human 5-HT<sub>3A</sub> receptors in outside-out patches of HEK 293 cells: basic properties and barbiturate effects. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2000c;362:255-265.

Barnes NM, Sharp T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 1999;38:1083-1152.

Belelli D, Balcerek JM, Hope AG, Peters JA, Lambert JJ, Blackburn TP. Cloning and functional expression of a human 5-hydroxytryptamine type 3AS receptor subunit. *Mol Pharmacol* 1995;48:1054-1062.

Boess FG, Martin IL. Molecular biology of 5-HT receptors. *Neuropharmacology* 1994;33:275-317.

Borgeat A, Wilder-Smith OH, Wilder-Smith CH, Forni M, Suter PM. Adjuvant propofol for refractory cisplatin-associated nausea and vomiting. *Lancet* 1992;340:679-680.

Bradley PB, Engel G, Feniuk W, Fozard JR, Humphrey PP, Middlemiss DN, Mylecharane EJ, Richardson BP, Saxena PR. Proposals for the classification and nomenclature of functional receptors for 5-hydroxytryptamine. *Neuropharmacology* 1986;25:563-576.

Brady CA, Stanford IM, Ali I, Lin L, Williams JM, Dubin AE, Hope AG, Barnes NM. Pharmacological comparison of human homomeric 5-HT<sub>3A</sub> receptors versus heteromeric 5-HT<sub>3A/3B</sub> receptors. *Neuropharmacology* 2001;41:282-284.

Brown M, Petric M. Evaluation of cell line 293 for virus isolation in routine viral diagnosis. *J Clin Microbiol* 1986;23:704-708.

Brown N, Kerby J, Bonnert TP, Whiting PJ, Wafford KA. Pharmacological characterization of a novel cell line expressing human  $\alpha(4)\beta(3)\delta$  GABA(A) receptors. *Br J Pharmacol* 2002;136:965-974.

Bruss M, Gothert M, Hayer M, Bonisch H. Molecular cloning of alternatively spliced human 5-HT<sub>3</sub> receptor cDNAs. *Ann N Y Acad Sci* 1998;861:234-5.:234-235.

Costall BNRJ. *Neuropharmacology of 5-HT<sub>3</sub>-receptor ligands*, Vol. vol.129 Springer, 1997.

Davies PA, Kirkness EF, Hales TG. Evidence for the formation of functionally distinct  $\alpha\beta\gamma\epsilon$  GABA(A) receptors. *J Physiol* 2001;537:101-113.

Derkach V, Surprenant A, North RA. 5-HT<sub>3</sub> receptors are membrane ion channels. *Nature* 1989;339:706-709.

Dong XP, Xu TL. The actions of propofol on gamma-aminobutyric acid-A and glycine receptors in acutely dissociated spinal dorsal horn neurons of the rat. *Anesth Analg* 2002;95:907-14, table.

Eberhart LH, Seeling W, Hartschuh T, Morin AM, Georgieff M. Droperidol and dimenhydrinate alone or in combination for the prevention of post-operative nausea and vomiting after nasal surgery in male patients. *Eur J Anaesthesiol* 1999;16:790-795.

Eisele JL, Bertrand S, Galzi JL, villers-Thiery A, Changeux JP, Bertrand D. Chimaeric nicotinic-serotonergic receptor combines distinct ligand binding and channel specificities. *Nature* 1993;366:479-483.

Feng HJ, Macdonald RL. Multiple actions of propofol on alphabeta gamma and alphabeta delta GABAA receptors. *Mol Pharmacol* 2004;66:1517-1524.

Forman SA, Miller KW. Molecular sites of anesthetic action in postsynaptic nicotinic membranes. *Trends Pharmacol Sci* 1989;10:447-452.

Franks NP, Lieb WR. Do general anaesthetics act by competitive binding to specific receptors? *Nature* 1984;310:599-601.

Frazer A, Maayani S, Wolfe BB. Subtypes of receptors for serotonin. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1990;30:307-48.:307-348.

Gaddum JH, Picarelli ZP. Two kinds of tryptamine receptor. 1957. *Br J Pharmacol* 1997;120:134-139.

Gothert M. 5-Hydroxytryptamine receptors. An example for the complexity of chemical transmission of information in the brain. *Arzneimittelforschung* 1992a;42:238-246.

Gothert M. 5-Hydroxytryptamine receptors. An example for the complexity of chemical transmission of information in the brain. *Arzneimittelforschung* 1992b;42:238-246.

Gunthorpe MJ, Peters JA, Gill CH, Lambert JJ, Lummis SC. The 4'lysine in the putative channel lining domain affects desensitization but not the single-channel conductance of recombinant homomeric 5-HT<sub>3A</sub> receptors. *J Physiol* 2000;522 Pt 2:187-98.:187-198.

Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* 1981;391:85-100.

Hargreaves AC, Lummis SC, Taylor CW. Ca<sup>2+</sup> permeability of cloned and native 5-hydroxytryptamine type 3 receptors. *Mol Pharmacol* 1994;46:1120-1128.

Hartig PR. A genome-based receptor nomenclature. *Ann N Y Acad Sci* 1997;812:85-91.

Hartig PR. Molecular biology of 5-HT receptors. *Trends Pharmacol Sci* 1989;10:64-69.

Hille B. Ion channels of excitable Membranes 1984.

Imoto K, Busch C, Sakmann B, Mishina M, Konno T, Nakai J, Bujo H, Mori Y, Fukuda K, Numa S. Rings of negatively charged amino acids determine the acetylcholine receptor channel conductance. *Nature* 1988;335:645-648.

Jackson MB, Yakel JL. The 5-HT<sub>3</sub> receptor channel. *Annu Rev Physiol* 1995;57:447-68.

Jenkins A, Franks NP, Lieb WR. Actions of general anaesthetics on 5-HT<sub>3</sub> receptors in N1E-115 neuroblastoma cells. *Br J Pharmacol* 1996;117:1507-1515.

Katz, THESLEFF S. A study of the desensitization produced by acetylcholine at the motor end-plate. *J Physiol* 1957;138:63-80.

Kazama T, Ikeda K, Morita K, Katoh T, Kikura M. Propofol concentration required for endotracheal intubation with a laryngoscope or fiberscope and its interaction with fentanyl. *Anesth Analg* 1998;86:872-879.

Kilpatrick GJ, Bunce KT, Tyers MB. 5-HT<sub>3</sub> receptors. *Med Res Rev* 1990;10:441-475.

Kovac AL. Prevention and treatment of postoperative nausea and vomiting. *Drugs* 2000;59:213-243.

Krasowski MD, Nishikawa K, Nikolaeva N, Lin A, Harrison NL. Methionine 286 in transmembrane domain 3 of the GABAA receptor beta subunit controls a binding cavity for propofol and other alkylphenol general anesthetics. *Neuropharmacology* 2001;41:952-964.

Lam DW, Reynolds JN. Modulatory and direct effects of propofol on recombinant GABAA receptors expressed in xenopus oocytes: influence of alpha- and gamma2-subunits. *Brain Res* 1998;784:179-187.

Lambert JJ, Peters JA, Hales TG, Dempster J. The properties of 5-HT<sub>3</sub> receptors in clonal cell lines studied by patch-clamp techniques. *Br J Pharmacol* 1989;97:27-40.

Lobitz N, Gisselmann G, Hatt H, Wetzel CH. A single amino-acid in the TM1 domain is an important determinant of the desensitization kinetics of recombinant human and guinea pig alpha-homomeric 5-hydroxytryptamine type 3 receptors. *Mol Pharmacol* 2001;59:844-851.

Lummis SC. The transmembrane domain of the 5-HT<sub>3</sub> receptor: its role in selectivity and gating. *Biochem Soc Trans* 2004;32:535-539.

Maricq AV, Peterson AS, Brake AJ, Myers RM, Julius D. Primary structure and functional expression of the 5HT<sub>3</sub> receptor, a serotonin-gated ion channel. *Science* 1991;254:432-437.

McCollum JS, Milligan KR, Dundee JW. The antiemetic action of propofol. *Anaesthesia* 1988;43:239-240.

Murasaki O, Kaibara M, Nagase Y, Mitarai S, Doi Y, Sumikawa K, Taniyama K. Site of action of the general anesthetic propofol in muscarinic M1 receptor-mediated signal transduction. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;307:995-1000.

Mutschler Ernst, Geisslinger Gerd, Kroemer Heyo K., Schäfer-Korting Monika. *Arzneimittelwirkungen* Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 2001.

Nagase Y, Kaibara M, Uezono Y, Izumi F, Sumikawa K, Taniyama K. Propofol inhibits muscarinic acetylcholine receptor-mediated signal transduction in *Xenopus* Oocytes expressing the rat M1 receptor. *Jpn J Pharmacol* 1999;79:319-325.

Orser BA, Wang LY, Pennefather PS, MacDonald JF. Propofol modulates activation and desensitization of GABAA receptors in cultured murine hippocampal neurons. *J Neurosci* 1994;14:7747-7760.

Ortells MO, Lunt GG. Evolutionary history of the ligand-gated ion-channel superfamily of receptors. *Trends Neurosci* 1995;18:121-127.

Patten D, Foxon GR, Martin KF, Halliwell RF. An electrophysiological study of the effects of propofol on native neuronal ligand-gated ion channels. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2001;28:451-458.

Peroutka SJ. Receptor "families" for 5-hydroxytryptamine. *J Cardiovasc Pharmacol* 1990b;16 Suppl 3:S8-14.:S8-14.

Peroutka SJ. 5-Hydroxytryptamine receptor subtypes. *Pharmacol Toxicol* 1990a;67:373-383.

Peters JA, Malone HM, Lambert JJ. Recent advances in the electrophysiological characterization of 5-HT<sub>3</sub> receptors. *Trends Pharmacol Sci* 1992;13:391-397.

Pistis M, Belelli D, McGurk K, Peters JA, Lambert JJ. Complementary regulation of anaesthetic activation of human ( $\alpha 6\beta 3\gamma 2L$ ) and *Drosophila* (RDL) GABA receptors by a single amino acid residue. *J Physiol* 1999;515:3-18.

Price KL, Lummis SC. The role of tyrosine residues in the extracellular domain of the 5-hydroxytryptamine<sub>3</sub> receptor. *J Biol Chem* 2004;279:23294-23301.

Reeves DC, Lummis SC. The molecular basis of the structure and function of the 5-HT<sub>3</sub> receptor: a model ligand-gated ion channel (review). *Mol Membr Biol* 2002;19:11-26.

Reimer EJ, Montgomery CJ, Bevan JC, Merrick PM, Blackstock D, Popovic V. Propofol anaesthesia reduces early postoperative emesis after paediatric strabismus surgery. *Can J Anaesth* 1993;40:927-933.

Sakmann B, Neher E. Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes. *Annu Rev Physiol* 1984;46:455-72.:455-472.

Schwieler L, Delbro DS, Engberg G, Erhardt S. The anaesthetic agent propofol interacts with GABA(B)-receptors: an electrophysiological study in rat. *Life Sci* 2003;72:2793-2801.

Shao XM, Yakel JL, Jackson MB. Differentiation of NG108-15 cells alters channel conductance and desensitization kinetics of the 5-HT<sub>3</sub> receptor. *J Neurophysiol* 1991;65:630-638.

Thompson AJ, Lummis SC. A single ring of charged amino acids at one end of the pore can control ion selectivity in the 5-HT<sub>3</sub> receptor. *Br J Pharmacol* 2003;140:359-365.



Tramer MR, Moore RA, Reynolds DJ, McQuay HJ. A quantitative systematic review of ondansetron in treatment of established postoperative nausea and vomiting. *BMJ* 1997a;314:1088-1092.

Tramer MR, Reynolds DJ, Moore RA, McQuay HJ. Efficacy, dose-response, and safety of ondansetron in prevention of postoperative nausea and vomiting: a quantitative systematic review of randomized placebo-controlled trials. *Anesthesiology* 1997b;87:1277-1289.

Tyers MB, Bunce KT, Humphrey PP. Pharmacological and anti-emetic properties of ondansetron. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1989;25 Suppl 1:S15-9.:S15-S19.

Unwin N. Neurotransmitter action: opening of ligand-gated ion channels. *Cell* 1993;72 Suppl:31-41.:31-41.

Yakel JL, Lagrutta A, Adelman JP, North RA. Single amino acid substitution affects desensitization of the 5-hydroxytryptamine type 3 receptor expressed in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:5030-5033.

Yang J. Ion permeation through 5-hydroxytryptamine-gated channels in neuroblastoma N18 cells. *J Gen Physiol* 1990;96:1177-1198.

## 8. Danksagung

Bei Herrn PD Dr. M. Barann möchte ich mich für die Themenstellung, die konstruktiven Ratschläge und die freundliche Betreuung und Beratung während dieser Arbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. Herzog danke ich herzlich für die nette Betreuung und Begutachtung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Urban möchte ich für die vielen Diskussionen und Anregungen danken, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herzlichen Dank sage ich Frau Dr. Bettina Bayerer für ihre Unterstützung in allen Computerfragen, für die vielen hilfreichen Gespräche und vor allem für ihre Freundschaft.

Herrn Klaus Retzmann danke ich für die Durchführung der HPLC-Experimente.

Besonders bedanken möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Urban und Prof. Dr. Stüber für die gute Zusammenarbeit, die große Hilfsbereitschaft sowie das angenehme Arbeitsklima.

Mein größter Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die den Verlauf dieser Arbeit in allen Phasen begleitet und durchlebt haben.

## 9. Veröffentlichungen

**Posterbeitrag und Abstract “7.th Internactional Conference on Basic and systemic mechanisms of anaesthesia (MAC 2005)” in Nara, Japan :**

“Kinetics of propofol effects on human 5-HT<sub>3A</sub> receptors”.

### **Publikationen**

Martin Barann, Michael Brüss, Marion Brinkmann, Isabelle Linden, Mina Lyutenska, Mark Schneider, Jan Walkembach, Maria Wittmann (2006). 5-HT<sub>3</sub> Receptors and Emesis. Pharmacological reports, in press.

### **Vorträge**

UCM Symposium Mai 2005 in Leipzig: „Kinetiken der Propofol- und Barbiturateffekte am 5-HT<sub>3A</sub> Rezeptor“

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Isabelle Linden  
Bonn, 2006